

***U*NIVERSIDAD DE *O*VIEDO**

**MASTER UNIVERSITARIO EN BIOLOGÍA  
Y  
TECNOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN**

***Perfil de expresión diferencial de  
interleuquinas en el tejido endometrial normal  
y en la endometriosis***

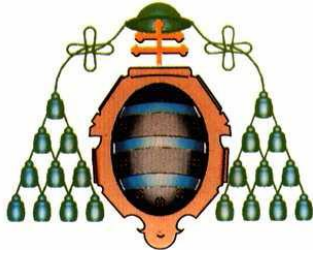
**TRABAJO FIN DE MÁSTER POR:**

**María Fernández Díaz**

**Tutor: Celestino González González**

**JUNIO 2012**





Celestino González González, Doctor en Fisiología por la Universidad de Oviedo, Profesor Titular de Fisiología del Departamento de Biología Funcional de la Universidad de Oviedo y profesor del Máster Universitario en Biología y Tecnología de la Reproducción por la Universidad de Oviedo.

Francisco José Vizoso Piñeiro, Doctor en Medicina por la Universidad de Oviedo, Jefe de la Unidad de Investigación de la Fundación Hospital de Jove.

Certifican:

Que el trabajo fin de máster presentado por Dña. María Fernández Díaz, titulado “Perfil de expresión diferencial de interleuquinas en tejido endometrial normal y en endometriosis”, realizado bajo la dirección del Dr. Francisco José Vizoso dentro del Máster Universitario en Biología y Tecnología de la Reproducción por la Universidad de Oviedo, reúne a nuestro juicio las condiciones necesarias para ser admitido como Trabajo Fin de Máster en la Universidad de Oviedo.

V<sup>a</sup>B<sup>o</sup>

Firma manuscrita en tinta azul de Celestino González González.

Fdo. Celestino González González  
Tutor del proyecto

V<sup>o</sup>B<sup>o</sup>

Firma manuscrita en tinta azul de Francisco J. Vizoso Piñeiro.

Fdo. Francisco J. Vizoso Piñeiro  
Director del proyecto



## ***ÍNDICE***

|  |    |
|--|----|
| ÍNDICE.....  | 1  |
| AGRADECIMIENTOS.....   | 4  |
| INTRODUCCIÓN .....   | 6  |
| 1. La infertilidad y sus posibles causas .....   | 7  |
| 2. Endometriosis.....  | 9  |
| 2.1 Definición y etiopatogenia .....   | 9  |
| 2.2 Localización e histopatología de la endometriosis.....   | 11 |
| 2.3 Clasificación de endometriosis.....  | 14 |
| 3. Epidemiología de la endometriosis .....   | 16 |
| 4. Factores de riesgo .....  | 16 |
| 5. Diagnóstico y tratamiento de la endometriosis.....  | 17 |
| 6. La endometriosis y la infertilidad .....  | 19 |
| 7. La endometriosis y la inflamación.....  | 20 |
| 1. IL-1 $\beta$ .....  | 23 |
| 2. IL-6.....   | 24 |
| 3. IL-17 .....   | 25 |
| HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS.....  | 26 |
| PACIENTES Y MÉTODOS .....  | 29 |
| 1. Selección de pacientes .....  | 30 |
| 2. Elaboración de mallas de tejido y tinción inmunohistoquímica .....  | 33 |
| 3. Análisis de la tinción tisular .....  | 37 |
| 4. Análisis estadístico .....  | 39 |
| RESULTADOS .....   | 40 |
| 1. Casos perdidos .....  | 41 |
| 2. Expresión global de IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-17 en el endometrio normal y la endometriosis.....   | 41 |
| 3. Expresión de IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-17 por los distintos tipos celulares, la localización y el grado de la endometriosis .....  | 44 |
| 4. Correlación en la expresión global de las interleuquinas IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-17 en el endometrio normal y la endometriosis.....  | 45 |
| 5. Relación de la expresión global de las IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-17 con las características clínico-patológicas de las pacientes controles y de las pacientes con endometriosis. |    |

|  |    |
|--|----|
| 6. Relación de la expresión por tipo celular de las IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-17 con las características clínico-patológicas de las pacientes controles normales y de las pacientes con endometriosis ..... | 58 |
| DISCUSIÓN.....   | 59 |
| CONCLUSIONES .....   | 64 |
| BIBLIOGRAFÍA.....  | 66 |

## ***AGRADECIMIENTOS***



La realización de presente proyecto no habría sido posible sin la ayuda de varias personas. Debo dar las gracias:

Al Dr. Francisco J. Vizoso, por dirigirme en este proyecto, por darme la oportunidad de incorporarme a su grupo de investigación y por ayudarme en la realización del presente proyecto.

Al Dr. Celestino González González por guiarme en este trabajo, pero sobre todo por facilitar el desarrollo del mismo tanto en calidad de tutor como de director del máster.

Al equipo humano del Servicio de Anatomía Patológica por poner a mi disposición, no solo las muestras utilizadas, sino su tiempo y paciencia. Sobre todo agradecer al Dr. Luis Ovidio González y a la Dra. Nana Beridze, patólogos de la unidad, su tiempo empleado en analizar la intensidad de las tinciones, así como resolver las innumerables dudas que me asaltaban.

A mi grupo de compañeras de laboratorio, Noemí, Lucía, Sara y Belén, por hacer más ameno los días difíciles y ayudarme a sacar adelante, y a tiempo, este trabajo.

A todos mis compañeros de máster, porque entre buenos y malos momentos he apreciado lo bonito que es conocer a gente nueva. En especial al fondo norte, por preocuparse por mí, por hacerme reír, pero sobre todo porque sé que me voy con muy buenos amigos para toda la vida.

A la gente nueva que ha aparecido en mi vida y me ha dado la gran oportunidad de aprender y crecer científica y personalmente con ellos; gracias por haber confiado en mí.

A mi hermano, por sus sabios y jocosos consejos en los buenos y malos momentos.

Y por supuesto a mis padres, por confiar desde el principio en mí, por animarme y alentarme haciéndome creer que el trabajo y el esfuerzo tienen su recompensa tarde o temprano, pero sobre todo por estar siempre ahí. Por ellos y para ellos.

## ***INTRODUCCIÓN***

## ***1. La infertilidad y sus posibles causas***

La infertilidad se define como la incapacidad para concebir un hijo de manera natural, o de llevar a término un embarazo después de un año de vida sexual activa.

El *Consejo Internacional de Difusión de Información sobre Infertilidad* considera que una pareja es infértil si:

- No han concebido después de más de 12 meses manteniendo relaciones sexuales sin protección, o después de 6 meses si la mujer tiene más de 35 años de edad. La duración reducida para mujeres de más de 35 años se debe al rápido declive de la fertilidad a partir de esa edad.
- No puede llevarse el embarazo a término.

La infertilidad afecta aproximadamente al 15% de las parejas. Alrededor del 21% de los casos se deben a un factor masculino, el 33% a un factor femenino, el 40% es de tipo mixto, y el resto (6%) a causas desconocidas.

Existen muchas razones por las cuales una pareja puede no ser capaz de concebir, o no ser capaz de hacerlo sin asistencia médica. Las causas de infertilidad femenina son múltiples y algunas de ellas se indican a continuación:

- Edad avanzada: a medida que aumenta la edad por encima de los 35 años comienzan a reducirse las posibilidades de embarazo, debido a que los órganos reducen su capacidad de máximo funcionamiento con el tiempo.
- Enfermedades de la tiroides o de las glándulas suprarrenales.
- Obesidad.
- Trastornos alimenticios.
- Alcohol, drogadicción, tabaquismo y otros tóxicos.
- Enfermedades hepáticas que afectan al metabolismo de los estrógenos.
- Diabetes.
- Malformaciones en el útero, adenomiosis, infecciones y tumores.
- Malformaciones en el cérvix, **endometriosis**, cirugía, quistes, infecciones y tumores.
- Obstrucción en las trompas originada principalmente por **endometriosis**, infecciones, malformaciones, implantes ectópicos antiguos y tumores.

- Enfermedad inflamatoria pélvica: por infecciones y **endometriosis**.
- Tumores, quistes y **endometriosis** en los ovarios.
- Alteraciones en la vagina del moco cervical, alergia, infección, traumatismo, uso de lubricantes, etc.

Muy frecuentemente coexisten varias de las causas anteriores y el encontrar una causa no descarta la presencia simultánea de otras.

Las reacciones inflamatorias originadas por infecciones y **endometriosis** (muy común y con diversas localizaciones) suelen ocasionar obstrucción, adherencias, formación de quistes, etc., con efectos negativos para la fertilidad. Así, el tratamiento de la inflamación mejora las posibilidades de embarazo, siempre y cuando no haya otras causas asociadas.

La **endometriosis** es una de las principales causas de infertilidad y se define como la presencia de endometrio (recubrimiento de la cavidad uterina) fuera de la cavidad uterina. Ocurre en el 10% de las mujeres en edad fértil y afecta a entre un 30 y 50% de mujeres con infertilidad. Tiene lugar cuando las células endometriales, que revisten el útero de la mujer, crecen en otras partes del cuerpo. A diferencia de las células endometriales del útero, que se desprenden durante la menstruación, las que crecen fuera de él no se desprenden, causando dolor, sangrado e infertilidad, expandiéndose además de forma similar a como lo haría una infección o un tumor, lo cual sugiere deficiencias inmunológicas que permitirían la implantación de esas células.

## 2. *Endometriosis*

### 2.1 Definición y etiopatogenia

#### *Definición*

La endometriosis engloba dos tipos:

La **adenomiosis** (endometriosis interna), caracterizada por la presencia de endometrio en el interior del miometrio.

La **endometriosis** (propriadamente dicha) que se refiere a la endometriosis externa, en la cual el foco de células endometriales se encuentra fuera de la cavidad uterina y del miometrio. El presente trabajo se centra en este tipo de endometriosis.

La endometriosis es frecuentemente descrita como un enigma clínico, reflejando así la ausencia de una etiología establecida y de múltiples matices metodológicos.

La primera descripción de la condición inicialmente llamada “adenomioma” fue realizada en 1860 por el patólogo alemán Carl Von Rokitansky, quien encontró glándulas endometriales en el miometrio y designó a este hallazgo como “cistosarcoma adenoides *uterinum*”, aunque no fue hasta 1954 cuando Sampson creó el término de endometriosis.

La endometriosis se define como la presencia de glándulas y estroma endometrial fuera de la cavidad uterina, es decir, implantes ectópicos de tejido endometrial, que tiene efectos sobre el líquido peritoneal, el número y la actividad de los macrófagos y los picos de LH (hormona luteinizante) entre otros [1].

#### *Etiopatogenia*

Existen varias teorías para explicar la endometriosis. La teoría de la metaplasia celómica se basa en la capacidad del epitelio celómico; durante la etapa embrionaria para diferenciarse a diversos tipos de tejidos (como los conductos de Wolff o Müller, o el propio endometrio), lo cual también podría suceder en la vida extrauterina. Sin embargo, no se ha podido demostrar la capacidad de diferenciación del peritoneo

maduro, además del hecho de que los procesos metaplásicos aumentan con la edad, mientras que la endometriosis se limita a la vida reproductiva.

Otra teoría es la del transporte endometrial a distancia, que puede explicar localizaciones alejadas si se lleva a cabo por vía hemática o linfática, mientras que la teoría de la vía canicular de Sampson se refiere a la teoría de la menstruación retrógrada, que postula que el endometrio descamado en la menstruación pasa a la cavidad abdominal a través de las trompas. Esto presupone la capacidad del endometrio descamado para reimplantarse y desarrollarse.

Sin embargo, estas teorías por sí solas son incapaces de explicar por qué en unas mujeres se produce la endometriosis y en otras no ante las mismas circunstancias. El transporte endometrial, independientemente del modo que se produzca, requiere unos factores permisivos para su implantación y el desarrollo de la endometriosis. Estos factores permisivos pueden ser hormonales (puesto que los estrógenos no parecen ser necesarios para la implantación pero sí para su mantenimiento) o factores de crecimiento y factores angiogénicos procedentes de las propias células endometrióticas o de los tejidos circundantes.

La disfunción inmunitaria también se describe en la etiopatogenia ya que el autoantígeno de las células endometriales podría ser diferente en mujeres con endometriosis (o que los monocitos tuviesen una función alterada que lo interpretasen como diferente), lo que produciría una alteración en la producción de factores de crecimiento por los macrófagos y una respuesta diferente del clon de células T. En el caso de las células B, producirían autoanticuerpos que actuarían de forma indiscriminada sobre las células endometriales influyendo en la implantación ovocitaria condicionando así fenómenos de esterilidad e infertilidad.

La hipótesis más común en cuanto a la etiopatogenia de la endometriosis, es la teoría de la menstruación retrógrada, en el cual las células endometrióticas deben persistir y progresar. Por ello, la definición propuesta de la enfermedad incorpora estos dos nuevos conceptos, la persistencia y la progresión, y su uso puede aumentar la probabilidad de observar verdaderas asociaciones en los estudios etiológicos [2]. La hipótesis de la menstruación retrógrada se sostiene por sustanciales evidencias demostradas ya hace años:

- Se han encontrado células endometriales viables en el efluente menstrual y el fluido peritoneal. [3].
- El endometrio puede implantar y crecer sin cavidad peritoneal. [4].
- Todas las mujeres tienen cierto grado de menstruación retrógrada. [5].
- Existe una asociación entre la obstrucción menstrual y la endometriosis. [6].

Alrededor del año 2000, diversos estudios aportaron nuevos datos apoyando esta teoría, demostrando además de forma específica que el endometrio, tanto estroma como epitelio, pueden adherirse rápida y fácilmente al mesotelio intacto [7, 8]. Esto demuestra que el mesotelio intacto no parece constituir una barrera de defensa frente a la adhesión de fragmentos endometriales, y que las lesiones en el revestimiento mesotelial no son un prerrequisito para la adhesión de células endometriales.

En los últimos años se han identificado alteraciones específicas tanto constitutivas como adquiridas en tejido eutópico y ectópico en pacientes con endometriosis que favorecen la implantación endometrial. Moléculas implicadas en apoptosis, adhesión, angiogénesis, y en el mecanismo de escape inmunológico, han sido reconocidas como diferencias cualitativas y cuantitativas en el endometrio de mujeres con endometriosis comparado con el endometrio de mujeres sin la enfermedad [9, 10]. Esto puede explicar porque sólo algunas mujeres desarrollan la patología.

En este contexto ha de considerarse que la endometriosis por sí misma favorece una situación inflamatoria peritoneal que puede contribuir al mantenimiento de la patología [11]. Es posible que muchas de las alteraciones moleculares encontradas en endometrio ectópico de mujeres con endometriosis son más bien una consecuencia de la inflamación peritoneal que una causa de la enfermedad. Por otro lado, algunos de los cambios endometriales involucrados en la implantación pueden depender de una predisposición genética específica [12].

## **2.2 Localización e histopatología de la endometriosis**

La localización más abundante de la endometriosis es en los ovarios con un 50 y un 55% de todos los casos diagnosticados; le sigue las localizaciones tubáricas (12,8%) y peritoneal (16%) (sobre todo en porciones más declives como el fondo de saco de

Douglas (26%), ligamentos útero-sacros (60%), etc). Localizaciones menos frecuentes dentro del aparato genital las constituyen el cuello uterino, vagina, tabique recto-vaginal y vulva. Por otro lado, se han hallado lesiones también en el colon sigmoide, en el apéndice, cicatrices del abdomen y del ombligo, en el uréter e incluso en localizaciones mucho más alejadas del punto de migración como son el diafragma, la pleura, los pulmones, el bazo, la vesícula biliar o el riñón [13].

### *Histopatología*

El estudio histopatológico muestra que las lesiones endometriósicas consisten en glándulas endometriales o estructuras similares, mostrando características proliferativas o secretoras, que contienen estroma, y en las que se observa hemorragia. Como tal, la endometriosis está formada por lesiones típicamente hemorrágicas, que ocasionan reacción inflamatoria, fibrosis, adherencias y formación de endometrioma [14].

Se ha demostrado que existe una diferencia sustancial del tejido endometriósico según su localización; la endometriosis ovárica, la peritoneal y los nódulos adenomiósicos del septo rectovaginal son tres entidades diferentes. Indican que existe similitud entre el endometrio eutópico y las lesiones peritoneales, sugestivas de que estas lesiones representan el primer estadio de la implantación temprana de las glándulas y el estroma endometriales [15].

Las lesiones de endometriosis aparecen como implantes incoloros (aparentemente en las mujeres jóvenes), de color rojo cereza, azul oscuro o negros (en las mujeres mayores de 30 años), o blancos o amarillentos (que representan fibrosis), y son lesiones que generalmente abultan la serosa. Sin embargo, la lesión no siempre es observable, aún durante la magnificación con laparoscopia. Otras formas de presentación de la endometriosis son los quistes de “chocolate” y los defectos tipo quemadura o ventana.

En los análisis de anatomía patológica para la identificación y diagnóstico de la endometriosis, se diferencian dos estudios, uno a nivel macroscópico y otro a nivel microscópico.

En el análisis macroscópico, a nivel ovárico puede apreciarse desde un pequeño punteado granuloso de color frambuesa en la superficie, a una formación de grandes masas quísticas, conteniendo sangre antigua de color amarronado, por lo que reciben el



nombre de “quistes de chocolate”. Estos quistes son habitualmente encontrados en reproducción asistida a la hora de la punción de los folículos, lo que indica entonces la causa de la infertilidad femenina en esos casos.

A nivel cervical se aprecian punteados azulados, marrones o rojizos, a veces con tendencia a la hemorragia y ulceración superficial, y a nivel de vulva y vagina, suele manifestarse como nódulos azulados con frecuentes variaciones cíclicas. En otras localizaciones también se aprecian nodulaciones más o menos fibróticas y punteados marrones o rojizos con tendencia a la ulceración y sangrado

Al nivel peritoneal se aprecian puntos gris-azulados o amarronados de distintos tamaños en “quemadura de pólvora”; también placas blanquecinas, petequias rojas, áreas “en llama” o vesículas claras.

En el análisis microscópico, en la mayoría de los casos se observa la presencia ectópica de un endometrio normal con sus componentes glandular y estromales, que frecuentemente es funcional, sufriendo los típicos cambios de proliferación, secreción y descamación. En el caso de las endometriosis ováricas, comúnmente llamados “quistes ováricos de chocolate”, presentan un estroma endometrial con abundantes macrófagos cargados de hemosiderina (pigmento amarillo que indica mayor cantidad de hierro del necesario) y grasa.

### **2.3 Clasificación de endometriosis**

Existen numerosas clasificaciones, tanto descriptivas como para determinar el pronóstico. La más conocida ha sido la de Acosta, variantes es la de la Sociedad Americana De Medicina Reproductiva (SAMR). Esta clasificación establece los siguientes grados:

- Grado I o mínima
- Grado II o leve
- Grado III o moderada
- Grado IV o severa

Dichos grados se establecen de acuerdo a los siguientes parámetros establecidos por laparoscopia o laparotomía [16]:

- Localización: peritoneal, ovárica o tubárica.
- Tamaño: menor de 1 cm, de 1 a 3 cm, o mayor de 3 cm.
- Obliteración del fondo de saco de Douglas, parcial o total.
- Adherencias; laxas o firmes.

Muchos profesionales utilizan una tabla (figura 1) con diversas puntuaciones para asignar el grado de endometriosis a diagnóstico:

**PUNTUACION PARA VALORAR LA ENDOMETRIOSIS PELVIANA**

Laparoscopia ..... Fecha interv. ....

Laparotomía ..... Fecha interv. ....

| PERTONEO                | ENDOMETRIOSIS  | < 1 cm.      | 1 - 3 cm.      | > 3 cm.      |
|-------------------------|----------------|--------------|----------------|--------------|
|                         | Superficial    | 1            | 2              | 4            |
|                         | Profundo       | 2            | 4              | 6            |
| OVARIO                  | D. superficial | 1            | 2              | 4            |
|                         | Profundo       | 4            | 16             | 20           |
|                         | I. superficial | 1            | 2              | 4            |
|                         | Profundo       | 4            | 16             | 20           |
| OBLITERACION DE DOUGLAS |                | Parcial<br>4 | Total<br>40    |              |
| OVARIO                  | ADHERENCIAS    | Ocupan < 1/3 | Ocupan 1/3—2/3 | Ocupan > 2/3 |
|                         | D. laxas       | 1            | 2              | 4            |
|                         | Firmes         | 4            | 8              | 16           |
|                         | I. laxas       | 1            | 2              | 4            |
|                         | Firmes         | 4            | 8              | 16           |
| TROMPA                  | D. laxas       | 1            | 2              | 4            |
|                         | Firmes         | 4*           | 8*             | 16           |
|                         | I. laxas       | 1            | 2              | 4            |
|                         | Firmes         | 4*           | 8*             | 16           |
| <b>TOTAL</b>            |                |              |                |              |

FUENTE: The American Fertility Society, 1985.

\* Si las fimbrias tubáricas están completamente afectadas, asignar 16 puntos.

ENDOMETRIOSIS ADICIONAL ..... ☐ Est. I (mínimo) 1-5

PATOLOGIA ASOCIADA ..... ☐ Est. II (medio) 6-15

☐ Est. III (moderado) 16-40

☐ Est. IV (severo) 40

FIRMA DEL MEDICO .....

**Figura 1:** Tabla utilizada por algunos profesionales para asignar el grado de la endometriosis.

Sin embargo, actualmente tiene mayor interés la clasificación francesa denominada FOATI (F: foco; O: ovario; A: adherencias; T: trompas; I: inflamación) que incluye a la inflamación dentro del sistema de puntuación (tabla 1).

**Tabla 1:** Clasificación FOATI que incluye a la inflamación

| Foco<br>(implante) | Ovario        | Adherencias                                  | Trompas                  | Inflamación       |
|--------------------|---------------|--|--------------------------|-------------------|
| 0 No existe        | 0 Normal      | 0 Ausencia                                   | 0 Normal                 | Implante + ó x    |
| 1 < 1 cm           | 1 < 1 cm      | 1 Movilidad de trompas y ovarios conservada  | 1 Oclusión parcial       | Ovario + ó x      |
| 2 de 1 a 5 cm      | 2 de 1 a 3 cm | 2 Movilidad parcial de trompa y/u ovario     | 2 Oclusión total         | Adherencias + ó x |
| 3 > 5cm            | 3 de 3 a 5 cm | 3 Ausencia de movilidad de trompa y/u ovario | 3 Bilateral o multifocal | Trompas + ó x     |
| -                  | 4 > 5 cm      | 4 Douglas ocupado                            | -                        | -                 |

+: presencia de inflamación; x: histología dudosa o no comprobada.

### ***3. Epidemiología de la endometriosis***

A pesar de ser una enfermedad muy estudiada y de suponer un alto coste sanitario en cuanto a atención médica, existen pocos datos recientes acerca de la prevalencia e incidencia de esta patología. El conocimiento sobre la epidemiología de la endometriosis se ve obstaculizada por la incapacidad para diagnosticar esta enfermedad en la población general. Basado en un estudio de cohorte única, se estima que existe una prevalencia del 10% de esta enfermedad en la población general [17]; no existen estudios en cuanto a epidemiología en España, pero si se analizan los resultados de Alemania, existe una prevalencia de 8,1 por cada 1.000 mujeres, y una incidencia de 3,5 por cada 1.000 mujeres. Destacan además que la mayor prevalencia de la patología se encuentra en el rango de 35 a 44 años con un valor de 12,8 por cada 1.000 mujeres. [18].

Se considera que las estimaciones que se conocen en cuanto a prevalencia de la patología son solo “la punta del iceberg de la endometriosis”. Se estima que entre un 30 y un 50% de las mujeres sometidas a cirugía acaban siendo diagnosticadas de endometriosis de forma casual [19, 20], puesto que hasta un 43% de mujeres asintomáticas presentan esta patología [19, 21], e incluso existen mujeres cuyas lesiones no progresan o remiten espontáneamente [22]. Además, hay evidencias de que los resultados de estudios de incidencia de endometriosis dependen del método de diagnóstico y del marco de muestreo. De hecho, se considera que alrededor del 11% de las mujeres que padece endometriosis están sin diagnosticar a nivel poblacional, lo que conlleva errores en el diseño e interpretación de estudios epidemiológicos [23].

Existe una alta prevalencia (45-50%) de endometriosis entre mujeres con dolor pélvico crónico y asintomáticas (tanto fértiles como infértiles) que apoya la idea de que la endometriosis puede ser una condición para fisiológica [19].

### ***4. Factores de riesgo***

Los factores de riesgo de la endometriosis no están definidos con claridad. Las enfermedades autoinmunes, y el estrés a través del mecanismo de liberación de mediadores inflamatorios, parecen aumentar el riesgo de padecer esta patología [24-26]. Sin embargo, factores como la menstruación [27-30], la toma de anticonceptivos orales

[21, 31-33], historia familiar [34, 35] o el índice de masa corporal (IMC) [16, 27] no muestran una relación clara con el desarrollo o progresión de la enfermedad. Se sugiere un mayor riesgo asociado a alteraciones de los ciclos menstruales, un hecho relacionado directamente con los valores de IMC, y una relación inversa en cuanto a la paridad. En cuanto a los anticonceptivos orales, parece ser que suprimen la patología durante su uso, pero los implantes endometriales sobreviven y se reactivan tras el cese del tratamiento.

Por otra parte se ha descrito que factores como el tabaco y el ejercicio físico disminuyen el riesgo debido a su acción anti-estrogénica, [27, 28, 33].

## ***5. Diagnóstico y tratamiento de la endometriosis***

### *Diagnóstico*

Si bien la endometriosis no posee una clínica específica, hay algunos aspectos que permiten orientar su diagnóstico. En las adolescentes con dismenorrea intensa, la endometriosis puede estar presente hasta en un 50% de los casos. Las algias pélvicas (dolor menstrual) pueden aparecer también fuera de la regla, y suelen relacionarse con la profundidad de las lesiones. Las alteraciones menstruales y fenómenos hemorrágicos pueden producir la destrucción del tejido ovárico y provocar desde pequeñas alteraciones en el ciclo hasta la anovulación. Esto, junto a la hiperemia genital asociada (exceso de sangre), conduce a apoyar la teoría de la menstruación retrógrada como causa [13].

La esterilidad e infertilidad se da en un 30%-50% de mujeres con endometriosis. Existen varios factores que implican a la endometriosis entre las causas de esterilidad, como la destrucción y alteración de la función ovárica, la formación de adherencias pélvicas severas con distorsión e incluso obstrucción tubárica, y las sustancias producidas por el endometrio ectópico o células inmunitarias. Los macrófagos producen una alteración característica del líquido peritoneal que puede interferir en la motilidad y supervivencia de los espermatozoides, maduración folicular, expulsión y maduración del ovocito, fecundación, desarrollo y transporte de las primeras etapas del embrión.

Para el diagnóstico se utiliza la anamnesis (datos recogidos por un profesional sanitario mediante preguntas específicas) de forma orientativa, análisis bioquímicos (donde el marcador CA 125 está frecuentemente elevado en casos de endometriosis),

estudio por ecografía y la resonancia magnética nuclear (RMN), que aunque es una técnica muy sensible que permite identificar lesiones ocultas, su elevado coste hace que no se incorpore al habitual esquema diagnóstico.

Sin embargo, la técnica que más se usa para confirmar el diagnóstico de una endometriosis sigue siendo la laparoscopia o laparotomía, además de serlo también para el tratamiento quirúrgico, obteniéndose muy buenas tasas de embarazo y nacido vivo tras su utilización en ambos procedimientos [36].

### *Tratamiento*

La endometriosis es a menudo tratada quirúrgicamente, pero con una mayor tasa de recurrencia, lo que sugiere que una combinación de tratamiento quirúrgico y farmacológico podría proporcionar mejores resultados. El objetivo principal del tratamiento farmacológico para la endometriosis es detener el crecimiento y la actividad de las lesiones de endometriosis. Dicho tratamiento debe ser completamente individualizado [37], atendiendo a:

- Edad de la paciente.
- Deseo de descendencia.
- Tamaño, extensión y localización de los focos.

El tratamiento quirúrgico es el primer planteado aunque cada caso debe individualizarse. Se puede realizar una cirugía conservadora o agresiva; el caso de la cirugía conservadora se realiza en mujeres jóvenes, con focos relativamente poco extensos e intención reproductiva y se asocia con una mayor tasa de embarazo y una menor tasa de recurrencia a pesar de constituir una grave lesión sobre la reserva ovárica [38, 39]. En general, cabe conservar la anatomía pélvica al máximo posible. Posteriormente se requiere un ciclo de tratamiento adyuvante por lo menos durante 3-6 meses, y después reevaluar los resultados mediante RMN, ecografía, laparoscopia o incluso laparotomía a modo de “*second look*”. Conseguida la curación clínica, se recomienda la pronta gestación que, además de ser la meta deseada, se constituye en una forma ideal de tratamiento endocrino durante 9 meses, aunque este hecho no esté admitido por todos. En este tipo de tratamiento conservador se espera entre un 8 y un 15% de recidivas.

El caso de la cirugía agresiva se emplea para endometriosis extensas y mujeres con hijos. Se practica una histerectomía abdominal con doble anexectomía y eventual apendicectomía.

Además de la cirugía existen otras alternativas, como el tratamiento farmacológico que puede emplearse en tres situaciones:

1. Como adyuvante tras la cirugía para evitar recidivas, eliminando focos microscópicos, considerándose la indicación fundamental.
2. Como terapia primaria en casos leves que no requieran intervención quirúrgica o que sean meramente sospechados por la clínica.
3. Como terapia de mantenimiento a la espera de intentar la gestación.

Los principales objetivos de la terapia farmacológica incluyen el alivio de los síntomas, la resolución de los actuales implantes de endometriosis y la prevención de nuevos focos de tejido endometrial ectópico [40]. Este tratamiento farmacológico se basa principalmente en formar un ambiente hipoprogéstágeno-hipoestrogénico, inhibiendo la liberación de gonadotrofinas hipofisarias y provocando una “pseudomenopausia”.

Dar a conocer mejor la patogénesis de la endometriosis en los niveles celulares y moleculares nos puede dar la oportunidad de utilizar nuevos agentes específicos para el tratamiento, y con nuevos productos farmacéuticos que afectan la inflamación, la angiogénesis y la actividad de las metaloproteasas de matriz. Muchos de estos nuevos agentes prometedores pueden prevenir o inhibir el desarrollo de la endometriosis. Se necesitan ensayos clínicos para determinar si estas nuevas terapias son mejor que las actuales estrategias de tratamiento médico para la endometriosis [41].

## ***6. La endometriosis y la infertilidad***

Clínicamente, la endometriosis se asocia con la infertilidad, aunque la etiología de esta asociación no está clara.

Muchos estudios en reproducción asistida han sugerido tasas de embarazo menores en mujeres con esta patología, llegando a ser de casi la mitad comparado con mujeres sin endometriosis. Además, los resultados de fecundación in vitro (FIV),

sugieren una peor reserva ovárica en endometriosis avanzadas, calidad disminuida en ovocitos y embriones, y peores tasas de implantación; se han descrito además altas tasas de abortos, complicaciones en partos prematuros, restricciones de crecimiento intrauterino, y preeclampsia [42, 43]. El fluido peritoneal de mujeres con endometriosis, con altas concentraciones de citoquinas, factores de crecimiento, y macrófagos activados, se ha visto que es tóxico para el espermatozoides y tiene un efecto adverso en la supervivencia de los embriones [44].

Desde un punto de vista epidemiológico, el estadio I de la endometriosis no es más común en mujeres infértiles que en mujeres de la población general. Sin embargo, estadios entre II y IV son más frecuentes en mujeres infértiles [45].

El tratamiento más efectivo para la infertilidad asociada a endometriosis, sigue siendo la FIV [46], ya que se ha visto que las tasas de embarazo en mujeres con esta patología aumentaban tras hiperestimulación con inseminación intrauterina [46, 47]. Sin embargo, se ha demostrado que en mujeres con esta patología existe una mayor pérdida del embarazo, lo que puede asociarse a una alteración en la receptividad endometrial [48].

## ***7. La endometriosis y la inflamación***

La inflamación es una respuesta a la infección, irritación o lesión, que se conoce como un tipo de respuesta inmunitaria no específica, ya sea aguda o crónica. El tráfico de células inmunes es un componente importante del desarrollo endometrial cíclico en cada ciclo menstrual y son necesarias para la función del endometrio, produciendo una gran variedad de citoquinas. La inflamación altera la receptividad del endometrio, aunque también pueden desempeñar un papel en la reparación de tejidos y su remodelación. Por otro lado, afecta el trofoblasto y por tanto a su interacción con el endometrio. A pesar de todas estas alteraciones, sí es cierto que algunos componentes de la respuesta inmune son necesarios para la óptima fertilidad y la remodelación de los tejidos normales [49].

La endometriosis puede ser considerada una enfermedad inflamatoria; hay suficientes evidencias acerca del aumento de niveles de citoquinas y factores de crecimiento en el líquido peritoneal, alteraciones en la actividad de las células T, células B, mastocitos, células dendríticas y macrófagos en el endometrio ectópico y



en las lesiones endometriales. Además, los macrófagos peritoneales se ven incrementados en número, concentración y actividad en estas mujeres. Se sigue investigando el potencial que presentan los cambios en las células T reguladoras para influir en el establecimiento y progresión de la enfermedad [11, 50].

La patogénesis de la endometriosis puede estar asociada con la capacidad de las células endometriales de contrarrestar la respuesta inmunológica local [51]. Las evidencias encontradas tanto *in vitro* como *in vivo* muestran que la inmunología de la endometriosis exhibe características típicas de células capaces de evadir la inmunovigilancia [52-55] y no solo eso, sino que además es capaz de utilizar los mecanismos inflamatorios para promover su crecimiento dentro de la cavidad peritoneal [56].

Los casos sintomáticos se han asociado con la desregulación de la producción de citoquinas en el endometrio eutópico y ectópico [57]. Al menos en algunos casos, esto parece estar asociado con la inflamación crónica local y anticuerpos auto-reactividad [58]. Sin embargo, la enfermedad se asocia comúnmente con inflamación pélvica crónica; en la cavidad peritoneal de estas pacientes se encuentran niveles anormales de células inmunes, como macrófagos, natural killers y células dendríticas. Varios estudios han demostrado que las células inmunológicas peritoneales son disfuncionales y pueden contribuir al desarrollo de la endometriosis, más que a detectar y eliminar las células endometriales ectópicas como cabría esperar [59].

Lo que aún no se conoce con certeza es si los cambios inmunológicos que se encuentran en el tejido endometrial eutópico de pacientes con endometriosis es un acontecimiento primario o secundario [60].

En lo que respecta a la endometriosis, varios estudios han analizado citoquinas aisladas o paneles de las mismas, y se han encontrado resultados variados [61, 62], incluyendo alteraciones en la actividad de los linfocitos B, un incremento en los niveles de componentes del complemento C3 y C4, y la presencia de una mayor concentración de anticuerpos comparado con mujeres sin endometriosis [63, 64].

Las citoquinas son un grupo de proteínas solubles de peso molecular variable de las que se han identificado más de 200, y se han dividido en subgrupos: interleuquinas (IL), factores de crecimiento, quimioquinas, interferones (IFN), factores hematopoyéticos, y factores estimuladores de colonias [65].

Tradicionalmente las citoquinas han sido divididas en pro-inflamatorias (IL-1, IL-6, TNF $\alpha$ , TGF $\beta$ ,...) y anti-inflamatorias (IL-1Ra, IL-4, IL-10, IL-13,...). En muchas enfermedades se ha descrito un balance entre factores pro- y anti-inflamatorios, incluido en la endometriosis [66]. Algunas de ellas han sido estudiadas en células de la granulosa como potenciales marcadores de causa de infertilidad; la IL-23 y TNF $\alpha$  se relacionan con la endometriosis, mientras que un mayor CD44 pero menor IL-1 $\beta$  e IFN $\alpha$  se relacionan con infertilidad por factor tubárico entre otros [67]. En relación a esto se ha descrito el importante papel que juegan el IFN $\gamma$  y el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) en la ovulación y la fertilización, así como la IL-1 $\beta$  en la implantación [68].

Las interleuquinas son un subgrupo de citoquinas que actúan como mensajeros químicos a corta distancia, siendo sintetizadas por diferentes tipos celulares durante la activación de la inmunidad innata y adquirida. Principalmente son los leucocitos quienes las sintetizan, aunque también pueden intervenir células endoteliales, epiteliales o del estroma. Son proteínas de bajo peso molecular y su principal función es regular los eventos que atañen a las funciones de las células del sistema inmunitario, como la activación, diferenciación o proliferación celular, la secreción de anticuerpos, la quimiotaxis, la regulación de otras citoquinas y factores, entre otras [69].

Las interleuquinas son el principal medio de comunicación intracelular y sirven para iniciar la respuesta inflamatoria y definir la magnitud y naturaleza de la respuesta inmunitaria específica. Se conocen en la actualidad no menos de 33 interleuquinas [70]; mientras algunas de ellas (IL-4, IL-10, IL-11) presentan esencialmente efectos favorables, otras (IL-1, IL-6, IL-8), paralelamente a su función defensiva, pueden también ser deletéreas para el organismo [71].

Mediante el análisis de citoquinas secretadas en sangre y en la cavidad peritoneal se ha observado que pacientes con endometriosis tienen concentraciones mayores de IFN $\gamma$  (responsable de aumentar la resistencia a la apoptosis de células endometriales) e IL-10 en fluido peritoneal comparado con pacientes sin la enfermedad [72], resultados que sirvieron para confirmar estudios anteriores [73]. Sin embargo, en un estudio realizado en pacientes sometidos a fecundación in vitro, los autores concluyeron que la IL-10 tenía una concentración mayor en pacientes fértiles que en mujeres con endometriosis, y que además ocurría lo mismo en pacientes fértiles frente a mujeres infértiles sin causa aparente, lo que prueba que la respuesta de perfil anti-inflamatorio

(Th2) facilita la implantación trofoblástica al comienzo del embarazo. La IL-4 también se encontró aumentada en pacientes de endometriosis, tanto en concentración como en la expresión de su ARN mensajero; todo esto sugiere que la endometriosis es una enfermedad en la que ambas ramas de la respuesta inmune están involucradas, pero la información más significativa indica que existe un balance hacia la respuesta Th2 [66, 74].

Recientemente se ha postulado que ciertas interleuquinas inflamatorias, como son la IL-6 y la IL-1 $\beta$ , favorecen el aumento de la haptoglobina (eHp) endometrial en el tejido ectópico endometrial de casos de endometriosis, facilitando la patogénesis de la enfermedad [75].

La alteración del peritoneo repercute en la relación de células endometriósicas con la respuesta inmune. Además, las citoquinas, junto a otras sustancias vasoactivas, alteran la proliferación y diferenciación celular, así como la expresión de nuevos epítopos antigénicos y moléculas de adherencia celular. Como resultado de lo anterior se produce la inflamación, la respuesta inmune, la reparación, la fibrosis y las adherencias pélvicas, todos ellos características de la endometriosis.

### ***1. IL-1 $\beta$***

La IL-1 es principalmente producida por los macrófagos, y células epiteliales induce reacción de fase aguda y la activación y reconocimiento por parte de linfocitos T y macrófagos del lugar donde se desarrolla la respuesta inmunitaria. Actúa junto con el TNF en la inmunidad innata y la inflamación.

La familia de la IL-1 consiste en dos citoquinas pro-inflamatorias: IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , y el agente natural anti-inflamatorio, el antagonista del receptor de IL-1 (IL-1Ra o IL-1RN). Los genes que codifican estas interleuquinas comprenden un grupo que abarca 10.9 Mb en la posición 2q12-21. Las dos isoformas de la IL-1 ( $\alpha$  y  $\beta$ ) están codificadas por distintos genes, pero relacionadas estructuralmente pudiendo unirse al mismo receptor [76].

La IL-1 $\beta$  es una citoquina pleiotrópica que participa en varios procesos inmunológicos reproductivos que ocurren en un endometrio normal durante el ciclo menstrual [77]. Se ha demostrado que la expresión de IL-1 $\beta$  se incrementa en endometrio eutópico y en el fluido peritoneal de pacientes con endometriosis

comparado con controles [78], además de jugar un papel importante en el establecimiento y progresión de la endometriosis [77].

Varias evidencias indican que la apoptosis juega un papel crítico en la patogénesis de la endometriosis, demostrando que la apoptosis espontánea está disminuida en el endometrio eutópico y ectópico de pacientes con endometriosis comparado con controles [79, 80]. La participación de la IL-1 $\beta$  en este proceso no está clara, habiéndose descrito un papel pro-apoptótico [81], y anti-apoptótica de esta molécula [82].

En el caso de la endometriosis, recientemente se ha visto que la IL-1 $\beta$  reduce la apoptosis y decrece la expresión de Bax (proteína de la familia de Bcl2, pro-apoptótica) en células epiteliales de endometrio en pacientes con endometriosis. Esta interleuquina puede proteger las células endometriósicas sometidas a apoptosis además de ejercer su papel pro-angiogénico. Se especula además que los altos niveles de IL-1 $\beta$  encontrados en fluido peritoneal de mujeres con endometriosis puede favorecer el establecimiento y progresión de las lesiones endometriósicas mediante la promoción de formación de nuevos vasos sanguíneos y la protección de las células endometriósicas de la muerte celular programada [83].

## **2. IL-6**

La IL-6 es secretada principalmente por los macrófagos, y participa en reacciones de fase aguda, estimulando el crecimiento y diferenciación de los linfocitos T y linfocitos B.

La IL-6 se considera un importante indicador de la respuesta inflamatoria de fase aguda. La endometriosis e inflamación pélvica, y las enfermedades que se manifiestan con niveles elevados de IL-6, se asocian con una mayor infertilidad. Sin embargo, la relación entre los niveles de IL-6 y la calidad de los ovocitos no está aún clara. Elevados niveles de IL-6 asociado a la endometriosis pueden reducir la capacidad de fertilización del ovocito humano a través de un mecanismo que implica un deterioro de los microtúbulos y la estructura cromosómica [84].

La IL-6 puede tener un importante papel en la regulación del crecimiento de las células endometriales, como mediador de acción endocrina. Además, su acción como regulador inhibitorio puede hacer variar el comportamiento normal de las células endometriósicas [85].

### 3. IL-17

La IL-17 es principalmente producida por los linfocitos, y aumenta la síntesis de quimioquinas en las células endoteliales y los macrófagos.

La identificación de un nuevo subconjunto de células T helper (Th), las Th17 productoras de IL-17, han proporcionado una nueva visión acerca de la comprensión de los mecanismos moleculares de la reproducción [86].

La IL-17 aparece aumentada en enfermedades autoinmunes humanas como la esclerosis múltiple, la artritis reumatoide o la soriasis. Las células Th17 juegan un papel importante en la organización de la protección contra patógenos extracelulares y hongos que son difícilmente aclarados por la respuesta Th1 o Th2.

Hirata *et al* fue el primero en mostrar la presencia de células Th17 en el fluido peritoneal en mujeres con endometriosis mediante citometría de flujo, y la presencia de células productoras de IL-17A en células endometriósicas mediante inmunohistoquímica. Además se mostró la participación de la IL-17 en el incremento de producción de ciclooxygenasa-2 (COX-2) y de IL-8 por células del estroma, así como en la proliferación de células estromales, demostrando que la IL-17 estimula la respuesta inflamatoria y la proliferación de células del estroma, sugiriendo una importante participación de la IL-17 en la patogénesis de la endometriosis [87].

## ***HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS***

Clínicamente, la endometriosis se asocia con la infertilidad, aunque la etiología de esta asociación no está clara. Se sabe que afecta a la reserva ovárica, la calidad ovocitaria y embrionaria, las tasas de implantación y aumenta la tasa de aborto, entre otros factores.

Además, la endometriosis puede ser considerada una enfermedad inflamatoria ya que hay suficientes evidencias acerca del aumento de los niveles de factores inflamatorios y alteración del sistema inmune, y se sospecha que la patogénesis está asociada con la capacidad de las células endometriósicas de contrarrestar la respuesta inmunológica local.

Un mejor conocimiento de las moléculas inflamatorias que intervienen en el endometrio normal y la endometriosis, así como el mejor conocimiento de su patogenia, constituyen procesos necesarios para intentar llegar a una mejor comprensión del proceso que desencadena esta patología en mujeres en edad reproductiva.

El objetivo de este proyecto ha sido establecer el patrón diferencial de expresión de la IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-17 en el tejido endometrial normal y en la endometriosis. Para ello, se ha realizado un estudio inmunohistoquímico usando *arrays* de tejido y anticuerpos específicos contra los factores a estudio. Más de 1.000 determinaciones han sido realizadas en muestras de endometriosis de intervenciones quirúrgicas realizadas a 22 pacientes de leiomiomas o miomas de donde se obtuvieron las muestras de tejido endometrial normal y a 71 pacientes de endometriosis.

Los objetivos concretos que se han planteado para la realización del presente proyecto han sido:

1. Comparar la expresión global de las interleuquinas: IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-17, entre el tejido endometrial normal y la endometriosis.
2. Determinar la expresión de estos factores por las células epiteliales, las células mononucleares inflamatorias y los fibroblastos en el tejido endometrial normal y la endometriosis.
3. Correlacionar la expresión de estas interleuquinas entre sí y respecto a la localización y grado de la endometriosis.
4. Relacionar la expresión global de las interleuquinas con las características clínico-patológicas de las pacientes en el tejido normal y la endometriosis.
5. Relacionar la expresión de las interleuquinas por las células epiteliales, las células mononucleares inflamatorias y los fibroblastos con las características clínico-patológicas de las pacientes con tejido normal y las pacientes con endometriosis.



## ***PACIENTES Y MÉTODOS***

## **Consideraciones éticas**

El estudio ha sido aprobado por el Comité de Ética e Investigación de la Fundación Hospital de Jove.

### ***1. Selección de pacientes***

Se analizan las muestras procedentes de la intervención quirúrgica de 22 pacientes afectadas por otras patologías ginecológicas benignas de donde se obtuvo el tejido normal (alejado de la patología benigna) y de 71 pacientes afectadas por endometriosis.

Todas las pacientes procedían del Hospital de Jove y sus Historias Clínicas se obtuvieron de los archivos de Historias Clínicas del área de Anatomía Patológica y del servicio de Ginecología del propio Hospital de Jove.

Se seleccionan 22 casos de mujeres fueron intervenidas entre enero de 2010 y febrero de 2012 por patologías benignas, como miomas o leiomiomas, que no afectan a la integridad del tejido endometrial normal. Mediante análisis patológico se comprueba el buen estado del endometrio, seleccionando los casos que presenten un endometrio secretor y/o proliferativo. Las principales características de las pacientes controles se representan en la Tabla 1. Al ser una distribución no normal (prueba de Kolmogorov-Smirnov) la edad ha sido dicotomizada de acuerdo a la mediana.

Tabla 1: Características de las pacientes con tejido endometrial sano.

|      |                | Pacientes controles |
|------|----------------|---------------------|
|      |                | N (%)               |
| Edad |                |                     |
|      | $\leq 47$ años | 10 (45,5)           |
|      | $> 47$ años    | 12 (54,5)           |

Se seleccionan 71 pacientes con endometriosis e intervenidas entre enero de 2010 y febrero de 2012. Se incluyeron las pacientes con cualquier localización o grado de la endometriosis. Los criterios de exclusión fueron los siguientes:

- enfermedades oncológica ginecológica en el momento de la intervención
- historia previa de algún tipo de tumor ginecológico maligno
- ausencia de tejido suficiente en el bloque de parafina

Las principales características de las pacientes se representan en la Tabla 2. Al ser una distribución no normal (prueba de Kolmogorov-Smirnov) la edad ha sido dicotomizada de acuerdo a la mediana.

Tabla 2: Características de las pacientes con endometriosis.

|                     |                                    | Pacientes con endometriosis |
|---------------------|------------------------------------|-----------------------------|
|                     |                                    | N (%)                       |
| <b>Edad</b>         |                                    |                             |
|                     | ≤ 43 años                          | 36 (50,7)                   |
|                     | > 43 años                          | 35 (49,3)                   |
| <b>Localización</b> | Ovárica                            | 35 (49,3)                   |
|                     | Órganos pélvicos intraperitoneales | 19 (26,8)                   |
|                     | Fuera del aparato reproductor      | 17 (23,9)                   |
| <b>Grado</b>        |                                    |                             |
|                     | I                                  | 17 (24,6)                   |
|                     | II                                 | 7 (10,1)                    |
|                     | III                                | 45 (65,3)                   |
|                     | IV                                 | 0 (0)                       |

Las localizaciones de las endometriosis han sido estratificadas en tres grupos: i) la endometriosis ovárica se refiere a aquellas endometriosis localizadas en cualquiera de los dos ovarios; ii) las endometriosis localizadas en los órganos pélvicos intraperitoneales incluyen aquellas ubicadas en trompa, cérvix, endocérnix y útero; iii) en las endometriosis fuera del aparato reproductor incluyen aquellas localizadas en vejiga, apéndice cecal, pared abdominal, recto, peritoneo, intestino, íleon terminal, saco herniario y mesenterio.

## 2. *Elaboración de mallas de tejido y tinción inmunohistoquímica*

Con el fin de determinar la expresión de las interleuquinas en las muestras de tejido de cada uno de las pacientes, se han elaborado unas mallas de tejido o *arrays* de tejido, pudiendo procesar de esta forma hasta 32 muestras de pacientes simultáneamente.

Las muestras de tejido fresco se fijaron en formol tamponado al 4% durante un mínimo de 24h. Tras esto se realizó el estudio macroscópico y se incluyeron en parafina las secciones más representativas para el diagnóstico anatomopatológico. Para su inclusión se realizó el siguiente proceso:

Formol 15' - Alcohol 70° 30' - 70° 30' - 96° 30' - 96° 30' - 100° 30' - 100° 30' - 100° 45'  
- Xilol 60' - Xilol 60' - Xilol 60'

Tras la obtención de los boques de tejido y con la ayuda de un microtomo (Leica Microsystems GMBH, Wetzlar, Alemania), se hacen cortes con un grosor de 3µm y se tiñen con hematoxilina-eosina para posteriormente seleccionar la zona endometriósica en los casos de endometriosis y la zona de tejido endometrial sano en los controles. Usando estas laminillas como plantillas de los bloques de parafina, se elabora el *array* mediante un “*manual tissue microarray*” (Modelo MTA-1, Beecker instruments, Sun Praerie, Wisconsin, USA) (figura 1). Se extrae uno a uno los cilindros de parafina del bloque receptor, rellenando los huecos con el tejido extraído del bloque donante. Al mismo tiempo se realiza una plantilla indicando la situación de cada uno de los casos, así como el número de biopsia correspondiente. Se realiza un *array* duplicado con los mismos casos que en el *array* inicial. Una vez terminado el *array* se lleva a la estufa a 60°C durante 10 min para la correcta unión de los cilindros al bloque de parafina. Para el corte del *array*, éste se enfría previamente. Los cortes se realizan en el microtomo

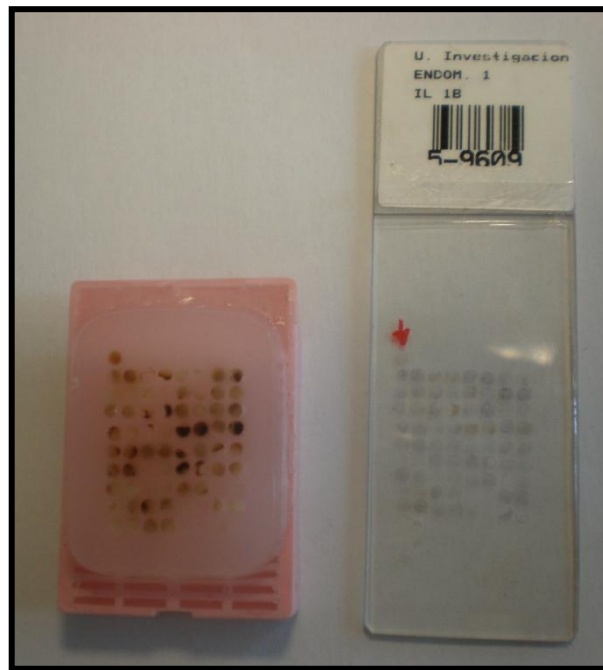
con un grosor de 3µm. y son recogidos posteriormente en portaobjetos pretratados para su uso en el inmunoteñidor.



***Figura 1:*** Construcción de un tissue-array

Sobre estas laminillas se realizó el estudio inmunohistoquímico utilizando los siguientes Anticuerpos: IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-17 (figura 2).

Antes de la inmunotinción se realiza el desparafinado y el desenmascaramiento antigénico. Existen dos opciones según el anticuerpo: con pretratamiento de calor o con ausencia de pretratamiento.



**Figura 2:** Tinción inmunohistoquímica realizada sobre un array.

En el caso de la inmunotinción del presente proyecto, todos los anticuerpos requieren un pretratamiento con calor. Este pretratamiento se realizó con el sistema automatizado PT-Link (Dako, Glostrup, Dinamarca), el cual consta de dos tanques con diferentes soluciones de recuperación antigénica. Uno a pH=9,00, compuesto por una solución de Tris-EDTA (Target Retrieval Solution, Dako) y otro de pH=6,00 compuesto por un tampón citrato (Target Retrieval Solucion, Dako). Se usa uno u otro tratamiento dependiendo de las características del anticuerpo primario. Este sistema lleva a la laminilla a 95°C durante 20 minutos, atemperándose posteriormente hasta 65°C. Finalmente, las secciones se mantuvieron un mínimo de 5 minutos en tampón de lavado.

Para aquellas laminillas con los cortes ya fijados, desparafinados y con el desenmascaramiento antigénico hecho, comienza entonces la tinción automática. La técnica de inmunohistoquímica consta de los siguientes pasos:

- a) lavado en tampón
- b) bloqueo de la peroxidasa endógena con peróxido de hidrógeno al 3% durante 5 minutos
- c) incubación con el anticuerpo primario (el tiempo de esta incubación depende del anticuerpo usado, Tabla 2)
- d) el exceso de anticuerpo se elimina con tampón de lavado (Wash Buffer, Dako)
- e) lavado en tampón
- f) incubación de los cortes con el sistema de polímeros de dextrano durante 30 minutos (Envision™ Detection Kit, Dako). Este sistema de polímeros de dextrano se basa en la utilización de un polímero de alto peso molecular, al que se conjugan covalentemente un gran número de moléculas de peroxidasa y anticuerpo secundario (inmunoglobulinas anti-ratón/conejo)
- g) lavados con tampón
- h) visualización del marcaje inmunohistoquímico con tetraclorhidrato de diaminobencidina (DAB) (Dako) durante 7 minutos y 30 segundos
- i) contratinción con hematoxilina de Harris durante 2 minutos
- j) las muestras se lavan, se deshidratan con alcoholes de concentraciones crecientes y se montan con HistoLab (Pertex®). Por último se observan al microscopio óptico Olympus Bx51 a 400x.

Se incluyeron controles negativos para asegurar la especificidad de la técnica.

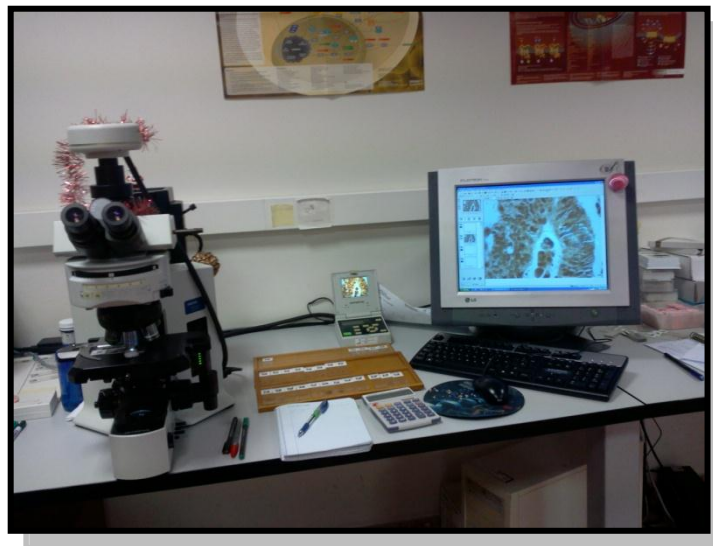


**Tabla 3:** Anticuerpos primarios utilizados en la tinción inmunohistoquímica

| <i>Anticuerpo primario</i>    | <i>Recuperación antigénica</i> | <i>Dilución del anticuerpo</i> | <i>Tiempo de incubación</i> | <i>Casa comercial</i> |
|-------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|-----------------------------|-----------------------|
| <b>IL-6</b>                   | pH6                            | 1:300                          | 120´                        | BioNova               |
| <b>IL-1<math>\beta</math></b> | pH6                            | 1:200                          | 120´                        | BioNova               |
| <b>IL17</b>                   | pH6                            | 1:200                          | 120´                        | Abbiotec              |

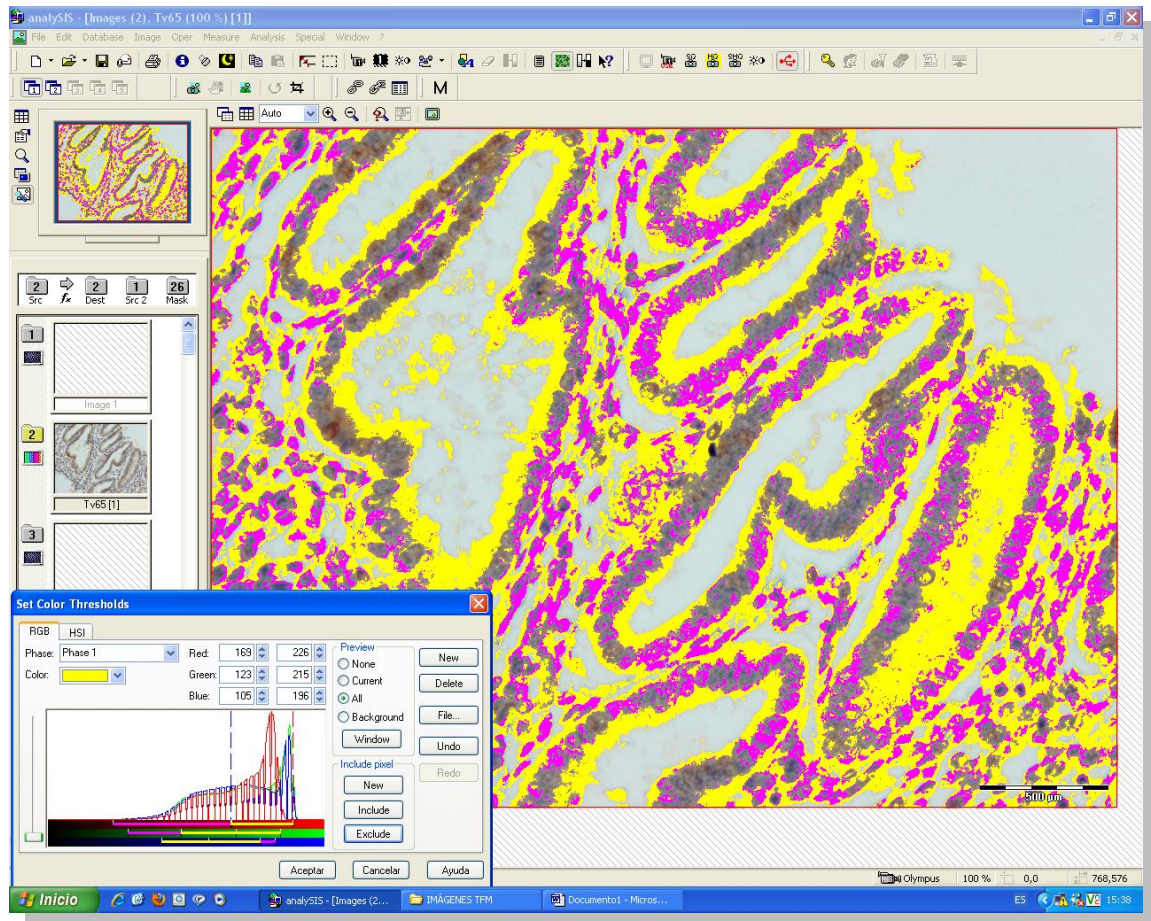
### 3. Análisis de la tinción tisular

Para cada anticuerpo, se estudió la localización de la inmunoreactividad en la muestra, el porcentaje de células teñidas y la intensidad de tinción de las mismas. En todos los casos se realizó una cuantificación del área teñida. Para ello se utilizó un sistema de análisis de imagen que utiliza un microscopio (Olympus BX51, figura 3) y un software adaptado al mismo (análisis, sofía Imaging system, Münster, Alemania).

**Figura 3:** instrumentación para el análisis de la tinción tisular

Cada laminilla fue teñida con el anticuerpo a estudio y contrastada con la tinción de hematoxilina, siendo los umbrales ópticos diferentes para cada tipo de tinción. Cada

muestra se analizó con un objetivo de 400x. Se busca el área con tinción positiva para la proteína a estudiar. Manualmente se selecciona el área teñida por el anticuerpo (que se verá como manchas marrones) y el software lo representa de color amarillo, y la zona teñida por la hematoxilina (el software lo representa en color rosa) (Figura 4).



**Figura 4:** Sistema de tinción y análisis de imagen.

Se obtuvo de cada campo un porcentaje de área teñida. Este porcentaje es el resultante de la relación entre el área teñida por el anticuerpo (en amarillo) y el área no teñida por el anticuerpo (en rosa, tinción de núcleos). Recordando que en las mallas de tejido se han hecho dos cilindros por cada paciente, y de cada cilindro se obtienen dos medidas en distintas áreas, se obtienen por tanto cuatro medidas de tinción en porcentaje de cada paciente, de las cuales se hace la media.

Para cuantificar la intensidad de tinción se sigue la siguiente escala numérica: **0** para la ausencia de tinción; **1** para tinción débil; **2** para tinción intermedia; **3** para tinción intensa.

Mediante una hoja de cálculo se calcula el valor medio de la tinción multiplicado por la intensidad.

#### ***4. Análisis estadístico***

Para realizar el análisis estadístico de los resultados obtenidos de las inmunotinciones, se utilizó el programa PASW 18. Las diferencias en porcentajes fueron calculadas con la prueba *Chi-cuadrado*. Los valores de tinción de cada interleuquina fueron expresados en forma de mediana (intervalo). La comparación de los valores de tinción entre los grupos fue realizada con la prueba de Mann-Whitney o de Kruskal-Wallis. La correlación entre la expresión de los factores a estudio ha sido llevada a cabo mediante el coeficiente de correlación de Spearman.

Las diferencias entre grupos se consideraron significativas cuando el valor de *p* era igual o inferior a 0,05.

## ***RESULTADOS***

## 1. Casos perdidos

A lo largo de la realización de este proyecto, no se han podido obtener resultados de las tinciones de inmunohistoquímica para las tres interleuquinas estudiadas en algunos casos. Esto ha sido debido a la ausencia de muestra tisular suficiente para realizar todas las determinaciones. Ha de recordarse que aunque las muestras obtenidas para el estudio provenían de intervenciones quirúrgicas, no siempre se ha podido tener acceso a todo el material necesario, ya que parte ha sido utilizado por el Servicio de Anatomía Patológica para el correcto diagnóstico. A estos casos se les ha denominado “casos perdidos” y se muestran en la tabla 1:

*Tabla 1: Casos perdidos del estudio.*

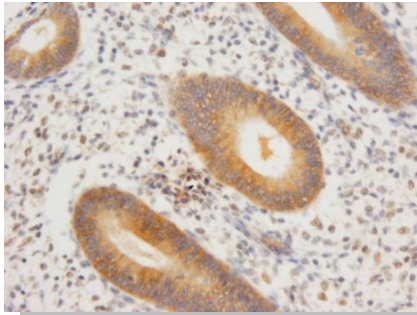
|                               | Endometrio Normal |          | Endometriosis |          |
|-------------------------------|-------------------|----------|---------------|----------|
|                               | Válidos           | Perdidos | Válidos       | Perdidos |
| <b>IL-1<math>\beta</math></b> | 22                | 0        | 57            | 14       |
| <b>IL-6</b>                   | 22                | 0        | 56            | 15       |
| <b>IL-17</b>                  | 22                | 0        | 60            | 11       |

## 2. Expresión global de IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-17 en el endometrio normal y la endometriosis

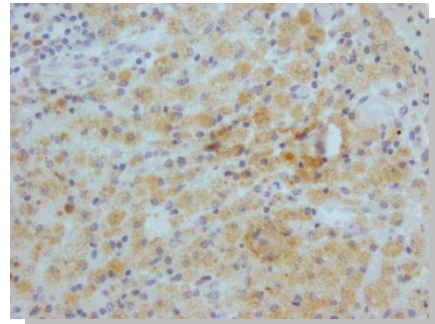
Uno de los objetivos de este proyecto ha sido determinar la expresión global (score) de las siguientes interleuquinas: IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-17, tanto en tejido endometrial normal como en tejido endometriósico.

En la figura 1 se puede observar de forma comparativa la diferente expresión de tinción de los tres factores estudiados en muestras de tejido endometrial de mujeres con endometriosis, frente a los controles de mujeres sanas. En estas imágenes (200x) se aprecia la expresión global teñida en color marrón de las células epiteliales (CE), células mononucleares inflamatorias (CMI) y fibroblastos (Fib) en ambos grupos de pacientes, mientras que en azul se observan teñidos los núcleos de los distintos tipos celulares.

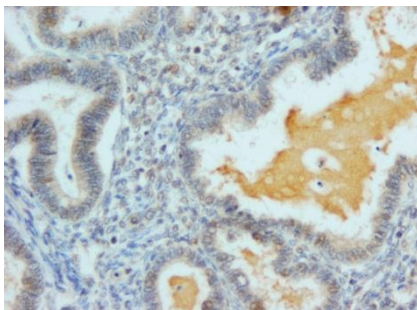




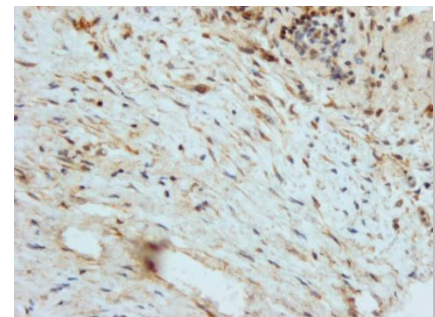
a) IL-1 $\beta$  en endometrio normal



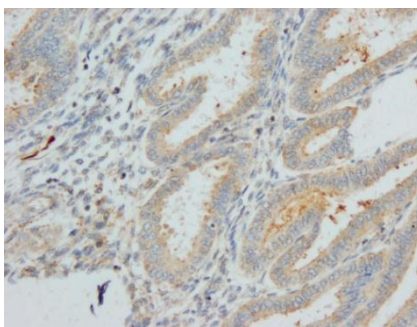
b) IL-1 $\beta$  en endometriosis



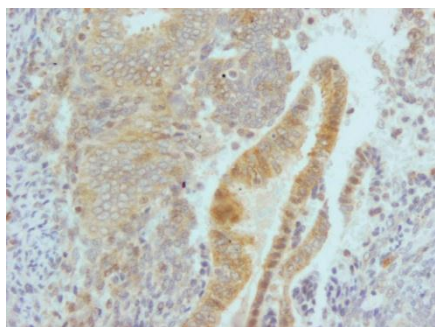
c) IL-6 en endometrio normal



d) IL-6 en endometriosis



e) IL-17 en endometrio sano



f) IL-17 en endometriosis

**Figura 1:** Tinción de tejido de endometrio normal y endometriósico para IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-17.

En la tabla 2 se define la expresión global de los tres factores a estudio en función de su mediana, describiendo además el intervalo mínimo y máximo de su expresión.

**Tabla 2:** *Expresión global de IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-17 en el tejido de pacientes controles y en el tejido de pacientes con endometriosis.*

| Endometrio Normal             |         |        |        | Endometriosis |        |        | Valor de p |
|-------------------------------|---------|--------|--------|---------------|--------|--------|------------|
|                               | Mediana | Mínimo | Máximo | Mediana       | Mínimo | Máximo |            |
| <b>IL-1<math>\beta</math></b> | 128,97  | 52,90  | 224,16 | 89,60         | 0      | 257,01 | 0,018      |
| <b>IL-6</b>                   | 175,65  | 53,91  | 236,40 | 87,00         | 0      | 188,74 | <0,0001    |
| <b>IL-17</b>                  | 161,42  | 58,84  | 261,87 | 91,44         | 0      | 266,52 | 0,009      |

En términos generales, la expresión de las tres interleuquinas estudiadas en endometrio normal muestra una mayor expresión de IL-6 seguida de la IL-17, y la IL-1 $\beta$ . Por otra parte, se puede observar que existe una expresión más elevada de los tres factores en el tejido normal respecto a la endometriosis.

En el caso de las endometriosis, los valores de las medianas son similares, observándose una expresión mínima de las tres interleuquinas en endometrio normal, mientras que existen casos de endometriosis, sin expresión de alguno de estos factores.

Para comprobar si existen diferencias significativas entre los datos se realizan test estadísticos no paramétricos (U de Mann Whitney para muestras independientes); de esta manera se establece una diferencia estadísticamente significativa mediante el valor de p. En relación a lo obtenido, se demuestra que existe una diferencia significativa entre la expresión de los tres factores, IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-17 en el endometrio normal y el tejido procedente de endometriosis.

### ***3. Expresión de IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-17 por los distintos tipos celulares, la localización y el grado de la endometriosis***

Un segundo objetivo en el presente proyecto fue evaluar el porcentaje de expresión de los diferentes factores en función del tipo celular, es decir, la expresión de cada uno de ellos por las células epiteliales, las células mononucleares inflamatorias y los fibroblastos, tanto en el tejido normal como en el procedente de endometriosis.

Como se aprecia en la tabla 3, en endometrio normal se observa que la expresión de los tres factores es similar en todos los tipos celulares estudiados. Sin embargo, cuando se analizan las mismas variables en la endometriosis, se muestra una expresión mayor por las células epiteliales frente a las células del estroma (células mononucleares inflamatorias y fibroblastos). Esa diferencia es además mayor para la IL-1 $\beta$ , en comparación con los otros dos factores.

Respecto a las células del estroma, no se aprecia diferencia alguna entre los tipos celulares que lo componen; el porcentaje de expresión es el mismo para las células inflamatorias que para los fibroblastos.

Se realizó un test de chi cuadrado para establecer posibles diferencias significativas en la expresión de las interleuquinas por los distintos tipos celulares en ambos tipos de tejido. Se ha observado una diferencia significativa en la expresión de IL-6 por las células mononucleares inflamatorias entre el tejido normal y la endometriosis, siendo aún más significativa cuando la IL-6 es expresada por los fibroblastos. Asimismo, la expresión de IL-1 $\beta$  e IL-17 por las células estromales es mayor en el tejido normal.



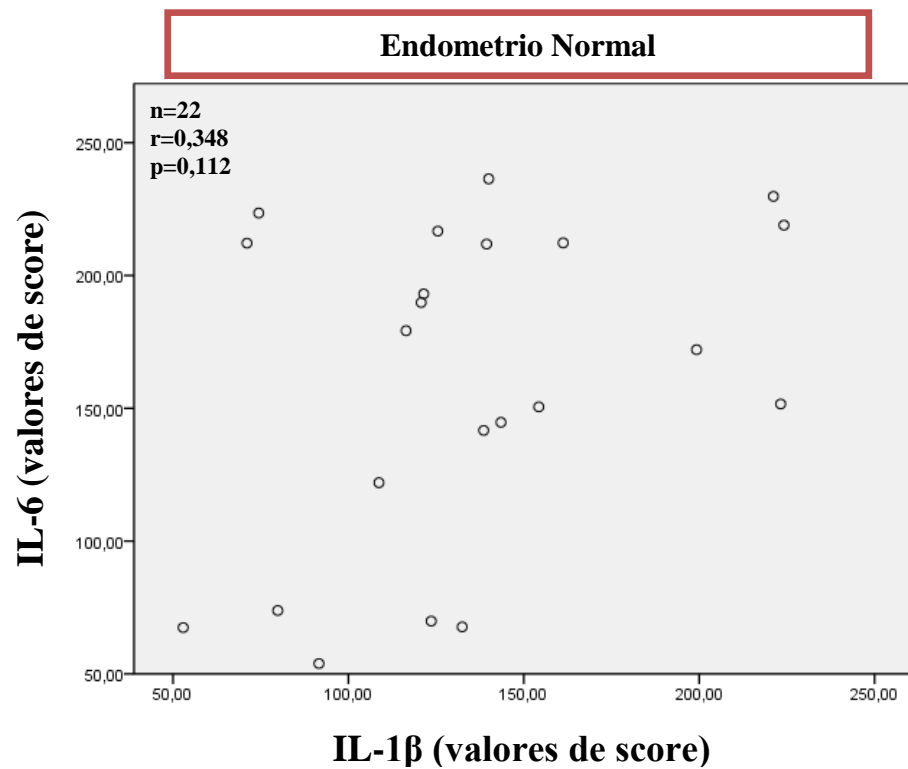
**Tabla 3:** Expresión de IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-17 por las células epiteliales (CE), células mononucleares inflamatorias (CMI) y fibroblastos (Fib).

|                               | Endometrio Normal<br>(N <sub>total</sub> =22) |              |              | Endometriosis<br>(N <sub>total</sub> =71) |              |              |
|-------------------------------|---|--------------|--------------|---|--------------|--------------|
|                               | CE<br>n (%)                                   | CMI<br>n (%) | Fib<br>n (%) | CE<br>n (%)                               | CMI<br>n (%) | Fib<br>n (%) |
| <b>IL-1<math>\beta</math></b> | 21 (95,5)                                     | 21 (95,5)**  | 21 (95,5)**  | 46 (83,6)                                 | 14 (24,6)    | 14 (24,6)    |
| <b>IL-6</b>                   | 21 (95,5)                                     | 19 (86,4*)   | 21 (95,5)**  | 39 (76,5)                                 | 23 (41,1)    | 23 (41,8)    |
| <b>IL-17</b>                  | 22 (100)                                      | 22 (100)**   | 22 (100)**   | 43 (81,1)                                 | 32 (54,2)    | 32 (54,2)    |

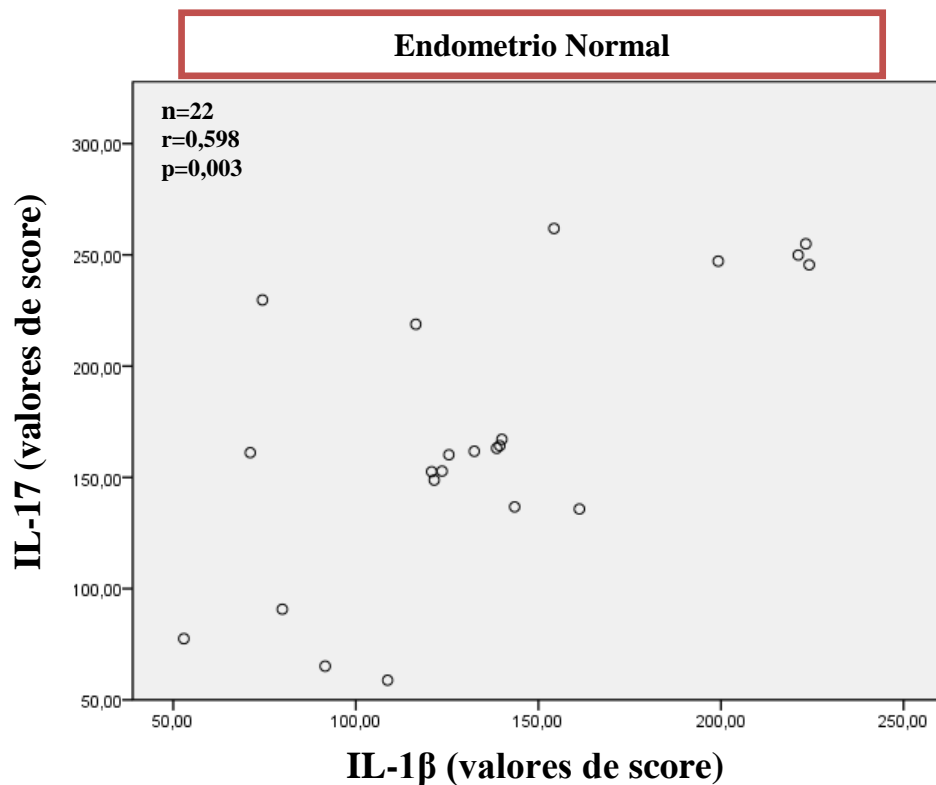
\* Valor de p=0,001 / \*\* Valor de p <0,0001

#### 4. Correlación en la expresión global de las interleuquinas IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-17 en el endometrio normal y la endometriosis

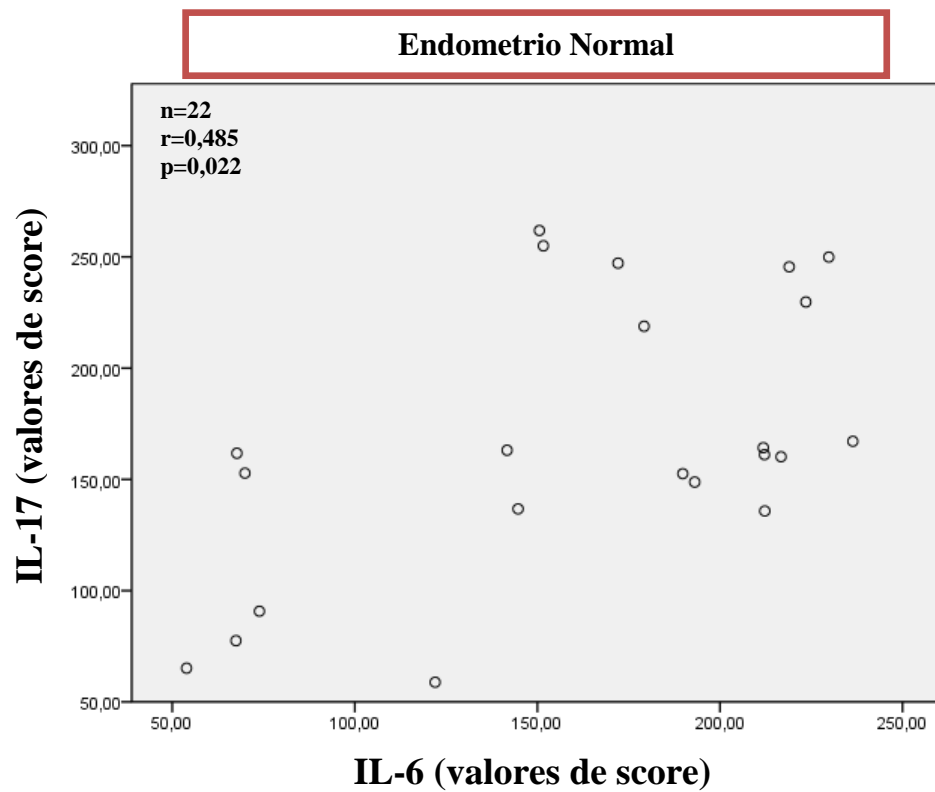
En el tejido normal, no se observó una correlación significativa entre la expresión de IL-1 $\beta$  y de IL-6, sin embargo existe una correlación directa entre la expresión de IL-1 $\beta$  y la expresión de IL-17 (p=0,003), así como entre la IL-6 y la IL-17 (p=0,022) (figuras 1, 2 y 3).



*Figura 1: Correlación entre la expresión de IL-1 $\beta$  y de IL-6 en endometrio normal.*

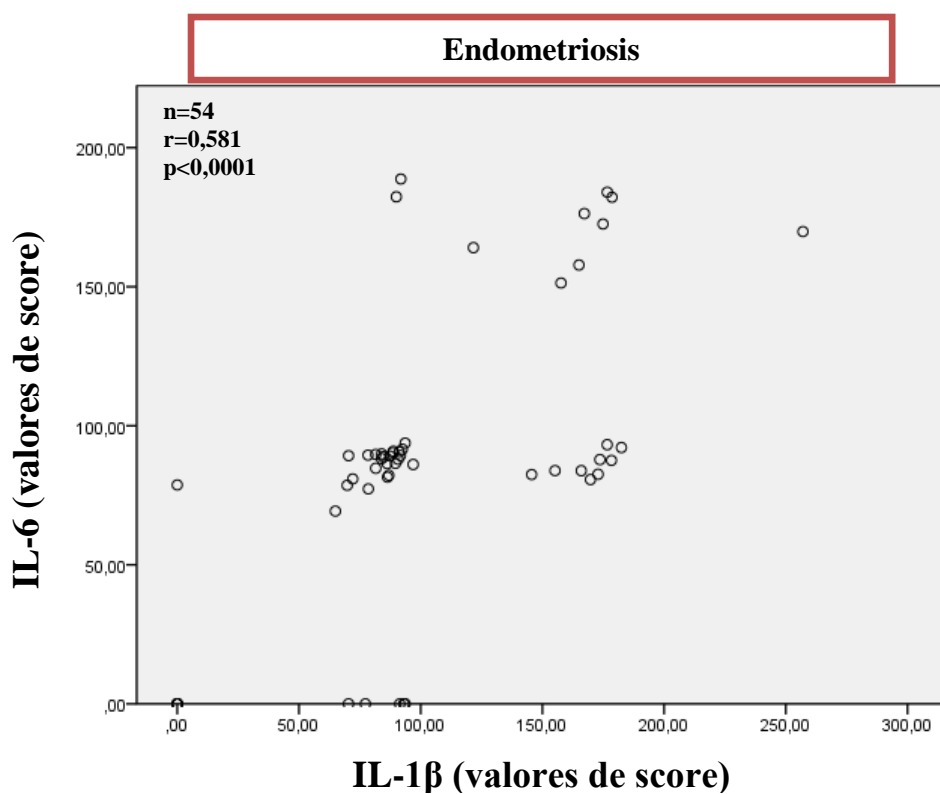


*Figura 2: Correlación entre la expresión de IL-1 $\beta$  y de IL-17 en endometrio normal.*

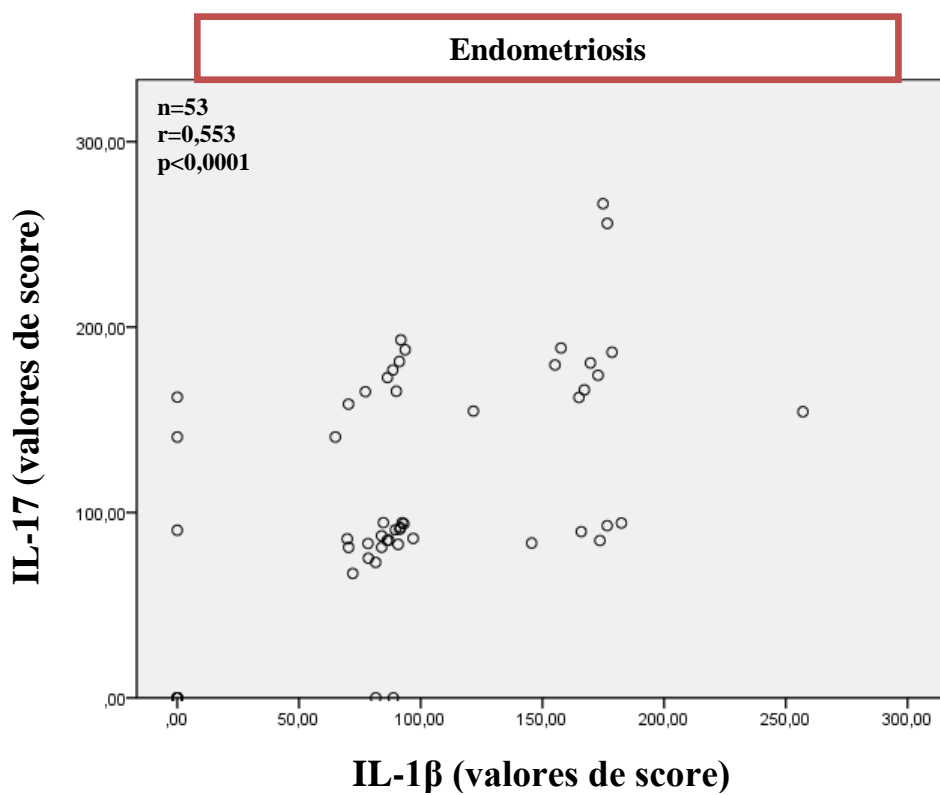


**Figura 3:** Correlación entre la expresión de IL-6 y de IL-17 en endometrio normal.

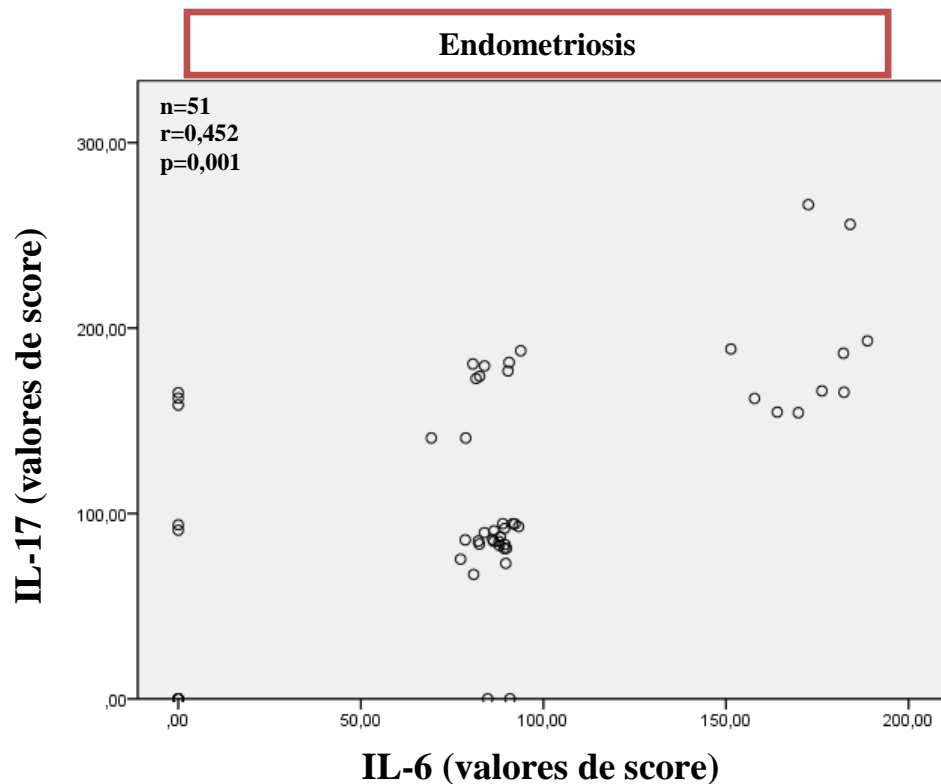
En el tejido proveniente de pacientes con endometriosis, se ha observado una correlación directa entre las interleuquinas estudiadas, teniendo una mayor significación la correlación de la IL-1 $\beta$  con la IL-6 y la IL-17 ( $p < 0,0001$ ), respecto a la IL-17 con la IL-6 ( $p = 0,001$ ) (figuras 4, 5 y 6).



*Figura 4: Correlación entre la expresión de IL-1 $\beta$  y de IL-6 en endometriosis.*



*Figura 5: Correlación entre la expresión de IL-1 $\beta$  y de IL-17 en endometriosis.*

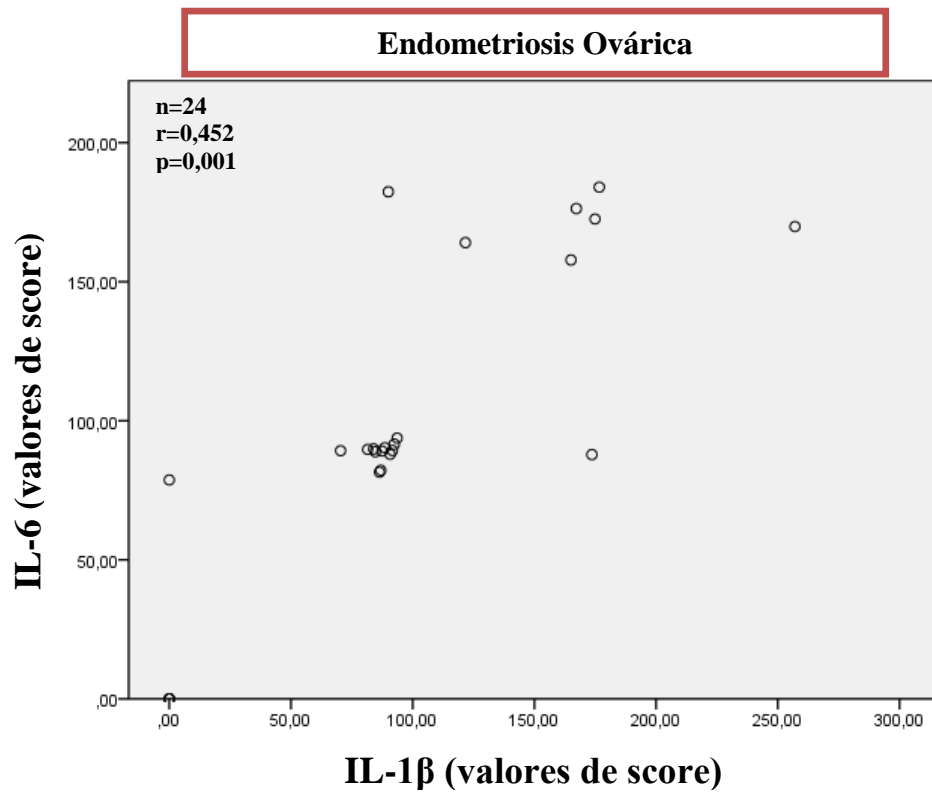


**Figura 6:** Correlación entre la expresión de IL-6 y de IL-17 en endometriosis.

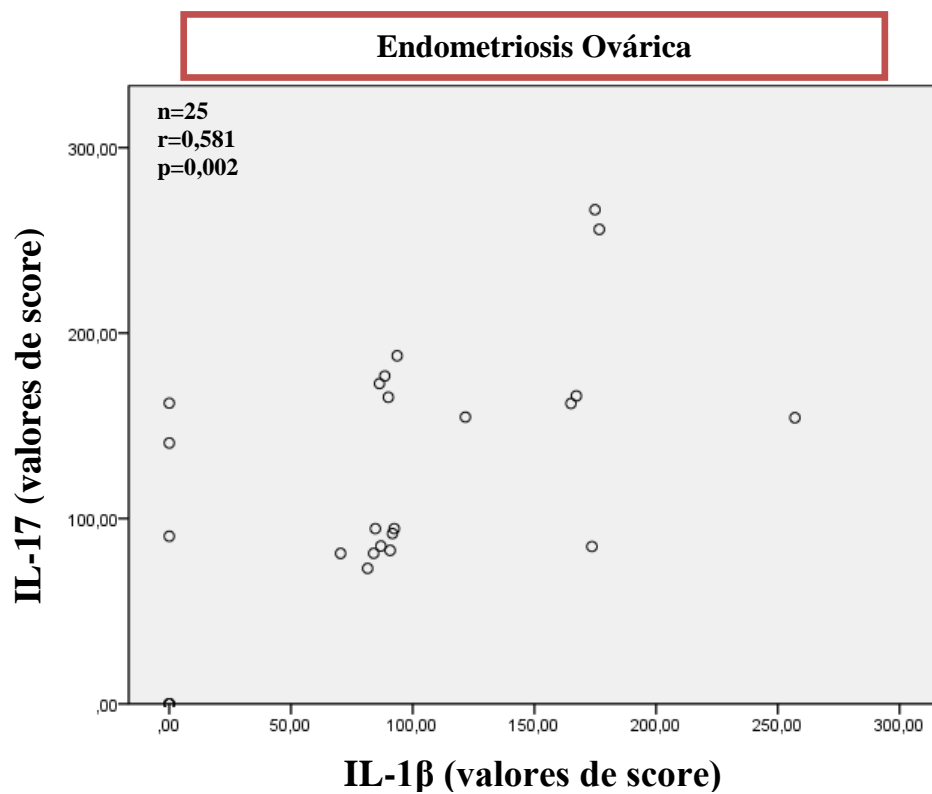
#### **a) Correlaciones según la localización de la endometriosis**

Continuando con los objetivos planteados en el este estudio, se ha intentado establecer una correlación significativa entre la expresión de IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-17 con las diferentes localizaciones de la endometriosis.

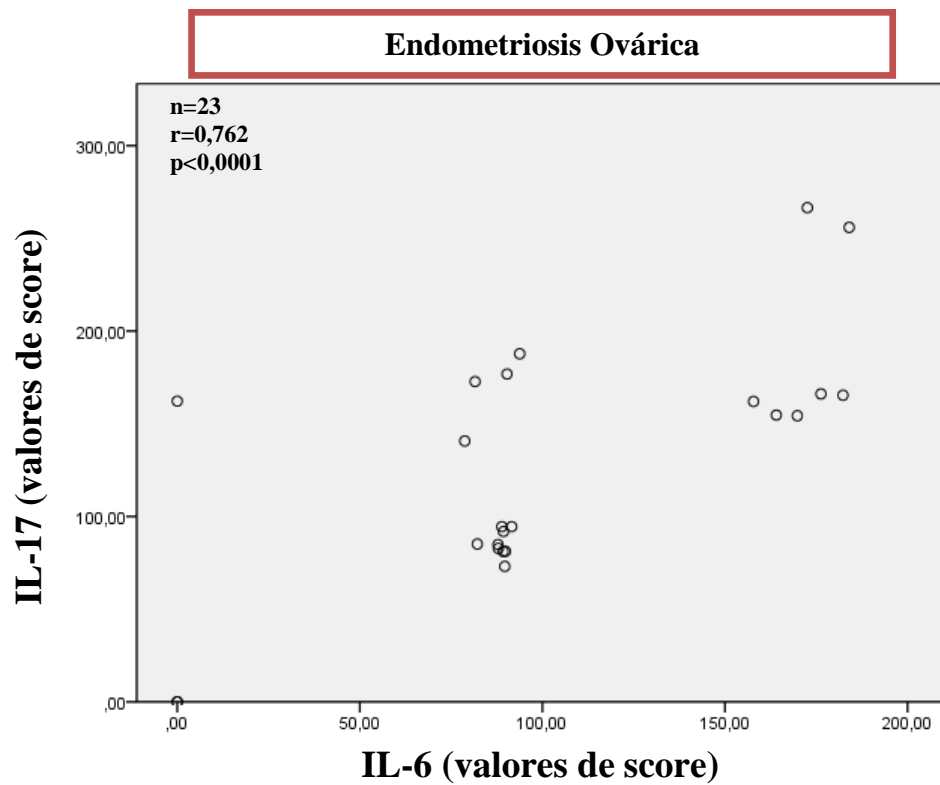
Se ha observado que cuando la endometriosis está localizada en el ovario, existe una correlación directa y significativa entre cada una de las interleuquinas estudiadas (figura 7, 8 y 9). Sin embargo, en la endometriosis localizada en los órganos pélvicos intraperitoneales sólo se ha observado una correlación directa y significativa entre la expresión de IL-1 $\beta$  y de IL-6 (figura 10).



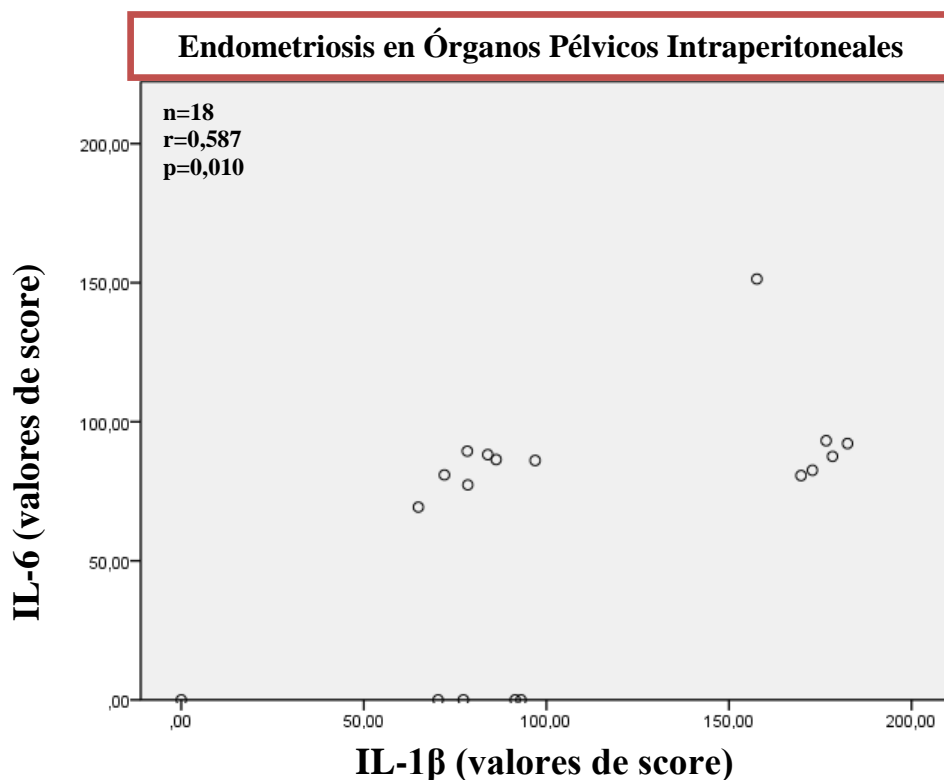
*Figura 7: Correlación entre la expresión de IL-1 $\beta$  y de IL-6 en endometriosis ovática.*



*Figura 8: Correlación entre la expresión de IL-1 $\beta$  y de IL-17 en endometriosis ovática.*

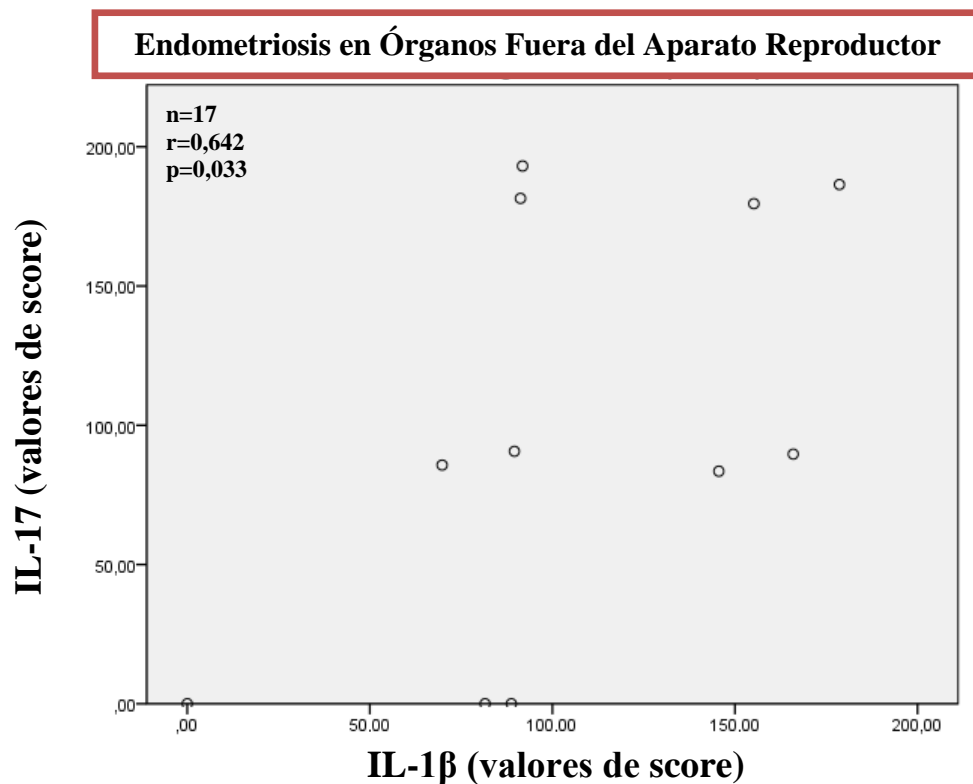


*Figura 9: Correlación entre la expresión de IL-6 y de IL-17 en endometriosis ovárica.*



*Figura 10: correlación entre la expresión de IL-1 $\beta$  y de IL-6 en endometriosis en órganos pélvicos intraperitoneales.*

En el caso de la localización en órganos fuera del aparato reproductor, no se observa correlación significativa entre la IL-6 y la IL-1 $\beta$ , ni tampoco entre la IL-6 y la IL-17. En el caso de la IL-1 $\beta$  junto a la IL-17 sí existe una correlación directa y positiva ( $r=0,642$ ;  $p=0,033$ ) (figura 11).

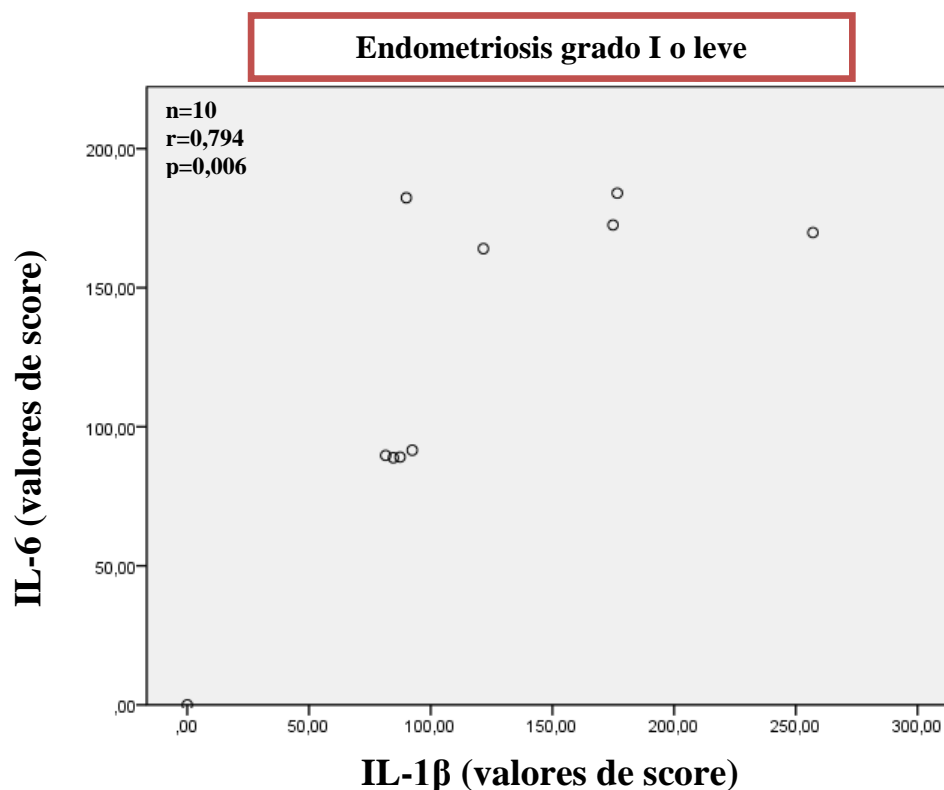


**Figura 11:** Correlación entre la expresión de IL-1 $\beta$  y de IL-17 en endometriosis en órganos fuera del aparato reproductor.

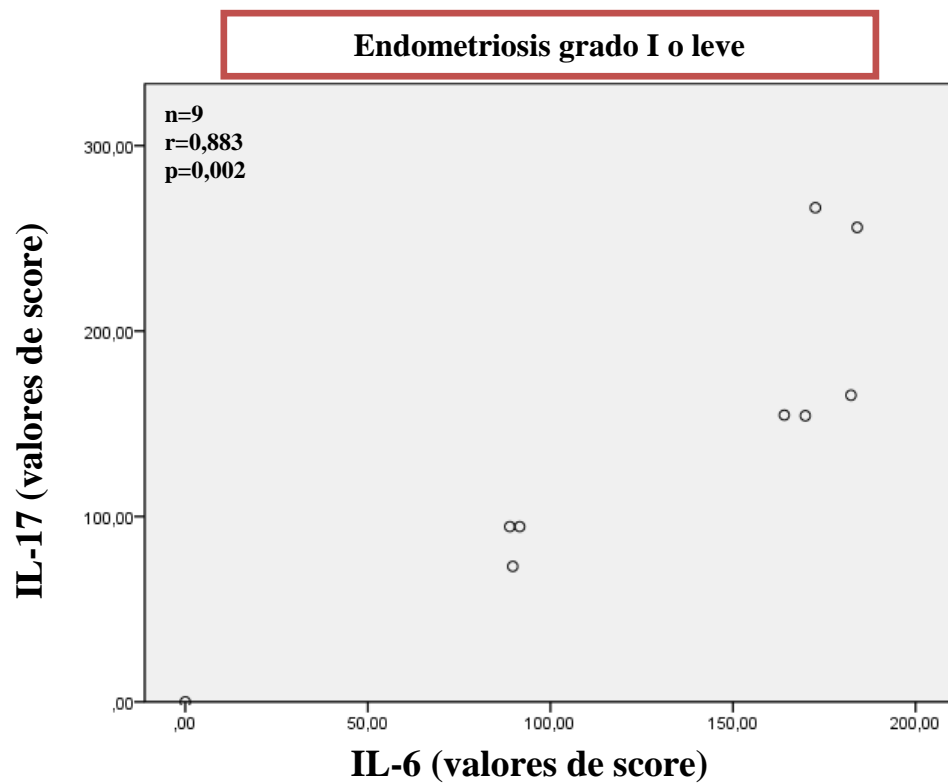


### b) Correlaciones en función del estadio

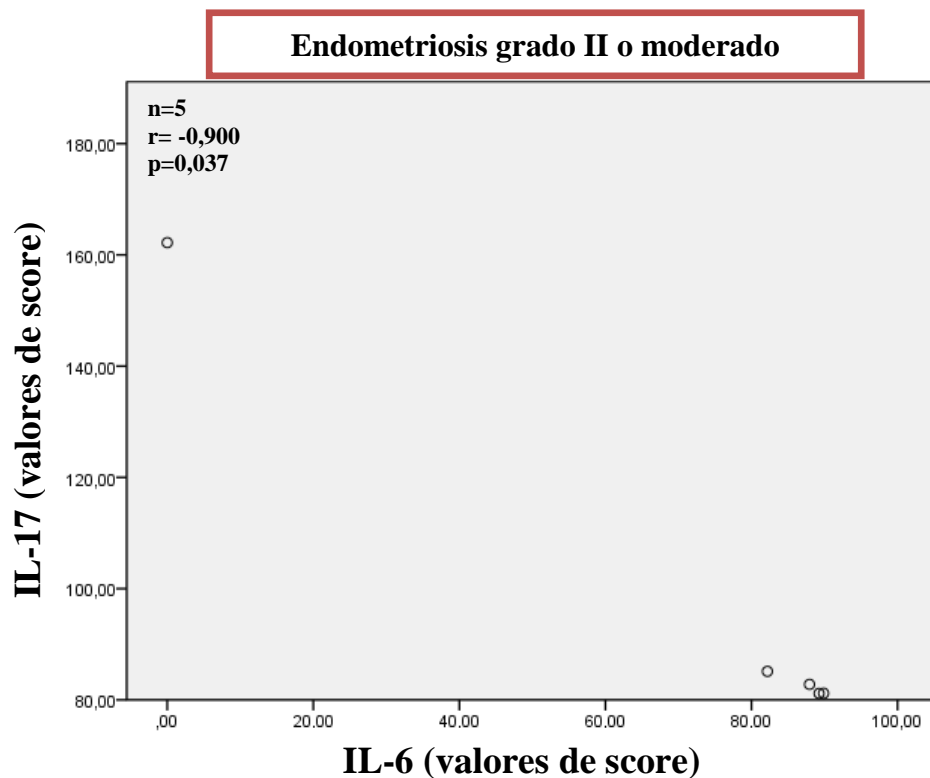
Al estudiar el estadio de la endometriosis, se observa una correlación positiva entre la IL-6 y la IL-17 en el estadio leve (I) y el grave (III) ( $p=0,006$  y  $p<0,0001$  respectivamente), no encontrando significación con la endometriosis moderada. En el estudio de la IL-1 $\beta$  junto a la IL-17, la correlación positiva solo se mantiene en el estadio grave (III) ( $p=0,003$ ). El caso más sorprendente es el de la correlación entre IL-6 e IL-17, ya que existe correlación positiva tanto en estadio leve ( $p=0,002$ ) como en grave ( $p=0,020$ ), pero los resultados para la endometriosis moderada muestran una correlación negativa estadísticamente significativa ( $r=-0,900$ ;  $p=0,037$ ) (figuras 12, 13, 14, 15, y 16).



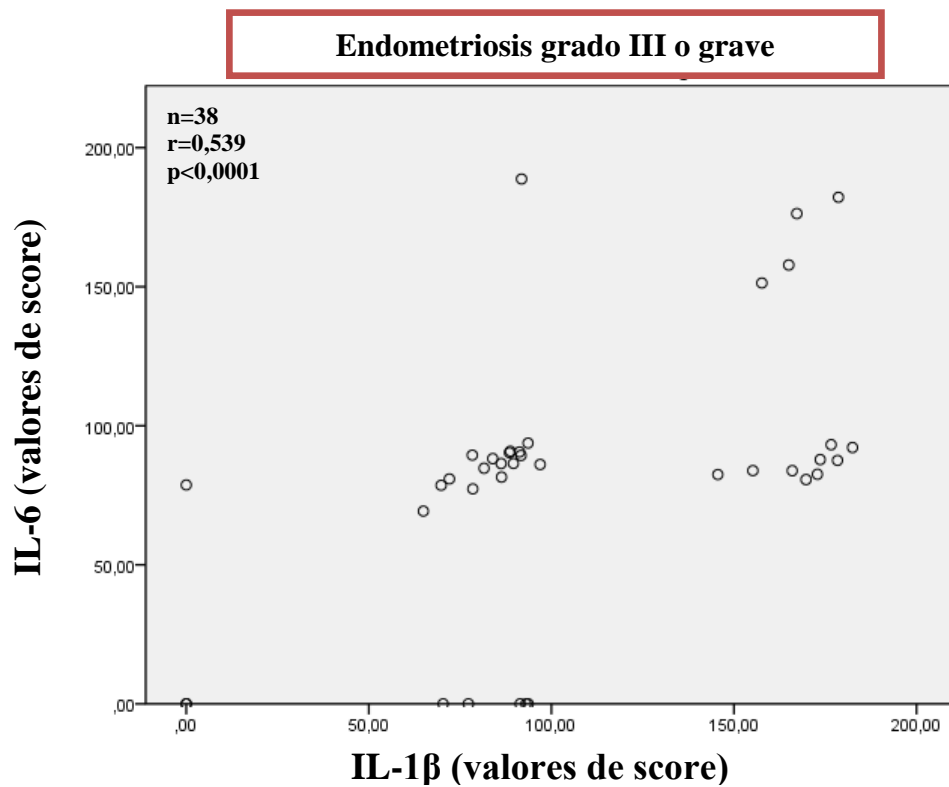
**Figura 12:** Correlación entre la expresión de IL-1 $\beta$  y de IL-6 en endometriosis grado I o leve



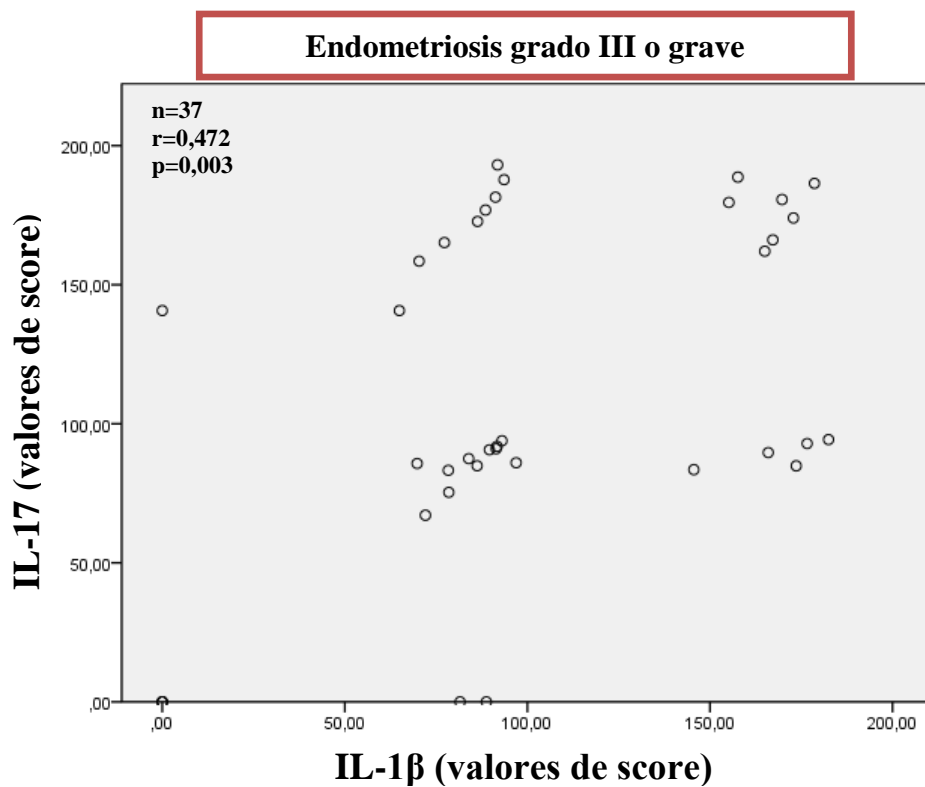
*Figura 12: Correlación entre la expresión de IL-6 y de IL-17 en endometriosis grado I o leve.*



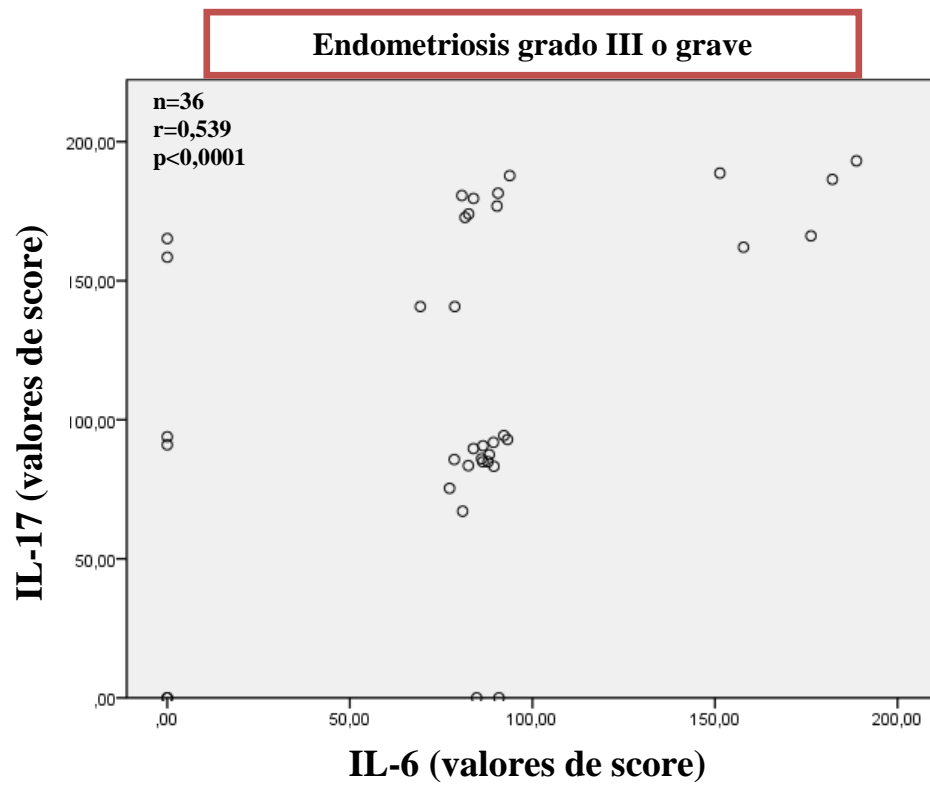
*Figura 13: Correlación entre la expresión de IL-6 y de IL-17 en endometriosis grado II o moderado.*



**Figura 14:** correlación entre la expresión de IL-1 $\beta$  y de IL-6 en endometriosis grado II o moderado.



**Figura 15:** Correlación entre la expresión de IL-1 $\beta$  y de IL-17 en endometriosis grado III o grave.



**Figura 16:** Correlación entre la expresión de  $IL-6\beta$  y de  $IL-17$  en endometriosis grado III o grave.

### 5. Relación de la expresión global de las IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-17 con las características clínico-patológicas de las pacientes controles y de las pacientes con endometriosis

Continuando con los objetivos iniciales planteados en este estudio, se ha intentado establecer una correlación significativa entre la expresión de IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-17 con las diferentes características clínico-patológicas de las pacientes tanto de tejido normal y endometriosis (tabla 7).

Para la determinación de la relación entre la distribución del score de los tres factores y la mediana de la edad de las pacientes, así como con la localización y el estadio endometriósico, se ha utilizado la prueba U de Mann-Whitney o de Kruskal-Wallis para muestras independientes.

La relación de la expresión global de las IL con las características clínico-patológicas de las pacientes controles y de las pacientes con endometriosis no ha mostrado significación, como se muestra en la tabla 7.

**Tabla 7:** Relación entre la expresión global (score) de los factores a estudio y las características clínico-patológicas de las pacientes controles y con endometriosis (valor de p).

|                     | Endometrio Normal |       |       | Endometriosis |       |       |
|---------------------|-------------------|-------|-------|---------------|-------|-------|
|                     | IL-1 $\beta$      | IL-6  | IL-17 | IL-1 $\beta$  | IL-6  | IL-17 |
| <b>Mediana edad</b> | 0,598             | 0,356 | 0,644 | 0,699         | 0,111 | 0,594 |
| <b>Localización</b> | -                 | -     | -     | 0,616         | 0,069 | 0,739 |
| <b>Grado</b>        | -                 | -     | -     | 0,094         | 0,083 | 0,183 |

### 6. Relación de la expresión por tipo celular de las IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-17 con las características clínico-patológicas de las pacientes controles normales y de las pacientes con endometriosis

Al analizar la expresión de las interleuquinas por los distintos tipos celulares en función de la localización de la endometriosis, se establecen algunas relaciones significativas como se muestra en la tabla 8.

Se ha relacionado la expresión de IL-1 $\beta$  tanto por las células mononucleares inflamatorias como por los fibroblastos según la localización de la endometriosis. El 25,9% de las endometriosis ováricas y el 58,3% de las localizadas fuera del aparato reproductor expresan la IL-1 $\beta$  por las células del estroma, mientras que en ningún caso se observa expresión en las endometriosis en órganos pélvicos intraperitoneales

En el caso de la IL-6, se ha encontrado también una relación significativa de la expresión por las células estromales y la localización. El 60% de las endometriosis ováricas así como de las localizadas fuera del aparato reproductor expresan esta interleuquina por el estroma, mientras que al igual que ocurre con la IL-1 $\beta$ , no se observa expresión en las endometriosis de órganos pélvicos intraperitoneales.

En el estudio de la expresión de IL-1 $\beta$  y de IL-6 por las células epiteliales, no mostró significación, al igual que para la IL-17 en todos los tipos celulares.

**Tabla 8:** Expresión de IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-17 según la localización de la endometriosis y las células mononucleares inflamatorias (CMI) y los fibroblastos (Fib).

|              |     | End, Ovárica<br>(N <sub>total</sub> =35)<br>n (%) | End. Órg.<br>Pelv. Intr.<br>(N <sub>total</sub> =19)<br>n (%) | End. Fuera Ap.<br>(N <sub>total</sub> =17)<br>n (%) | Valor de p |
|--------------|-----|---|---|---|------------|
| IL-1 $\beta$ | CMI | 7 (25,9)  | 0 (0)   | 7 (58,3)  | 0,001      |
| IL-1 $\beta$ | Fib | 7 (25,9)  | 0 (0)   | 7 (58,3)  | 0,001      |
| IL-6         | CMI | 15 (60,0)   | 0 (0)   | 8 (61,5)  | <0,0001    |
| IL-6         | Fib | 15 (60,0)   | 0 (0)   | 8 (61,5)  | <0,0001    |

n: número de casos positivos.

(%): porcentaje de casos que expresan ese factor respecto al total de caso de esa localización.

## ***DISCUSIÓN***

Una cuestión habitualmente planteada en el estudio de la endometriosis, es el hecho de porqué unas mujeres desarrollan la enfermedad y otras no, habiendo estado sometidas al mismo entorno. Se han encontrado alteraciones específicas tanto constitutivas como adquiridas en el tejido eutópico y ectópico de pacientes con esta patología, pertenecientes a mecanismos determinantes para el progreso y desarrollo de la endometriosis, como la inflamación [11, 88].

Este estudio tiene por objetivo establecer el perfil de expresión de interleuquinas tanto en el tejido de endometrio normal procedente de mujeres con patologías benignas como en el tejido endometrial ectópico de mujeres con endometriosis. Para ello se ha evaluado la expresión global y por tipo celular de tres interleuquinas pro-inflamatorias como son la IL-1 $\beta$ , la IL-6 y la IL-17. Asimismo, se ha analizado la expresión de dichos factores en función de la localización y grado de la endometriosis, con el fin de establecer una relación entre la expresión de los factores inflamatorios y la severidad de la enfermedad.

Comparando la expresión global de las tres interleuquinas estudiadas entre el tejido endometrial normal y el tejido procedente de implantes ectópicos, se ha visto que la expresión de IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-17 es mayor en el tejido normal que en el tejido patológico, sugiriendo que las células endometriósicas o bien el microambiente que les rodea pueden favorecer el escape inmunológico [60]. El sistema Fas/FasL está implicado en varios aspectos de la inmuno regulación, como la expresión de citoquinas. Se ha evidenciado que la expresión de FasL en mujeres con endometriosis puede ser un mediador del escape inmunológico [55]. En efecto, durante su implantación al peritoneo, las células estromales endometriales muestran una elevada expresión de FasL, sugiriendo que tras la adhesión a la matriz extracelular FasL puede proporcionar una tolerancia inmunológica [89].

El análisis de los resultados según el tipo celular muestra la misma tendencia que el análisis global comentado anteriormente. Se ha observado que existe una diferencia significativa en cuanto a la expresión de las tres interleuquinas por las células del estroma; tanto para las células mononucleares inflamatorias como para los fibroblastos, entre el tejido normal y la endometriosis. En el caso de las células epiteliales, también existe una diferencia de expresión de los tres factores, no llegando a ser significativa. Estas diferencias de



expresión de interleuquinas entre el tejido endometrial eutópico y ectópico muestran un papel distinto de los tipos celulares en el establecimiento y progresión de la endometriosis. Estos resultados reafirman el papel del estroma en la progresión de la endometriosis, pudiendo influir en la capacidad de proliferación y supervivencia de las células endometriósicas en el microambiente ectópico [90, 91].

Por otro lado, se ha observado que existe una correlación directa en cuanto a la expresión de las tres interleuquinas en la endometriosis. Salvo en el caso particular de la IL-1 $\beta$  y la IL-6 en el endometrio normal donde no existe correlación significativa. Estos resultados indican que cuando la expresión de una de estas interleuquinas disminuye, también lo hace la otra, evidenciando la existencia de un control simultáneo de las tres interleuquinas pro-inflamatorias.

Sin embargo, cuando se analiza dicha correlación atendiendo a la localización de la endometriosis, este comportamiento generalizado no siempre se mantiene. En la endometriosis localizada en órganos pélvicos intraperitoneales solo se observa una correlación directa entre la IL-1 $\beta$  y la IL-6, el resto de combinaciones deja de mostrar relación significativa. Siguiendo en esta línea, cuando la localización es fuera de los órganos del aparato reproductor, solo se correlaciona la expresión de IL-1 $\beta$  y la IL-17. En la endometriosis ovárica los tres factores son directamente correlacionados, significando que la expresión de IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-17 disminuye cuando una de ellas disminuye. Por tanto, el tejido sobre el cual se adhiere el tejido endometrial parece influir en la expresión de factores pro-inflamatorios. A la vista de estos resultados parece existir una mayor tolerancia inmunológica en los implantes ectópicos ováricos, lo que justificaría una mayor proporción de endometriosis en esa localización [13].

Cuando el análisis se realiza en cuanto al estadio de la endometriosis, se observa que en el grado I existe una correlación directa entre la expresión de IL-1 $\beta$  y de IL-6 y entre la expresión de IL-6 y de IL-17. Sin embargo en la endometriosis de grado II, existe una correlación inversa entre la IL-6 y la IL-17, pudiendo disminuir la expresión de IL-6 y aumentar la expresión de IL-17. En las endometriosis de grado III, los tres factores muestran correlación directa entre ellos. Este hecho puede indicar que cuando la endometriosis es aún leve, no están aún bien definidos los perfiles de expresión de los factores pro-inflamatorios,

mientras que a medida que se agrava, las interacciones entre las interleuquinas llegan a ir en el mismo sentido.

Por otro lado, no se ha mostrado relación entre la expresión de las interleuquinas y la edad de las pacientes del grupo control o de las pacientes con endometriosis, lo que apoya la hipótesis de que la edad, al menos en cuanto a factores pro-inflamatorios, no se considera un factor de riesgo de desarrollar la enfermedad [92, 93]. Del mismo modo, no se aprecia correlación significativa entre la expresión global de los factores a estudio con la localización y el grado de la endometriosis.

La diferente expresión según el tipo celular también es significativa cuando se analiza conjuntamente con la localización. En el caso de la IL-1 $\beta$  y de la IL-6 en las células del estroma se observa una mayor expresión de estos factores en endometriosis ovárica y en órganos fuera del aparato reproductor, mientras que sus valores de expresión en órganos pélvicos intraperitoneales no son apreciables en ningún caso. La bibliografía muestra que en el caso de células estromales de endometriomas ováricos (patología benigna), la IL-1 $\beta$  estimula la producción de activina-A, y ésta a su vez la expresión de IL-6, promoviendo entre todos la proliferación de este tipo de células [94]; quizás pueda darse una explicación similar a los resultados obtenidos, mostrando el papel que juega la IL-1 $\beta$  con la IL-6 en la progresión celular así como la correlación de expresión entre ellas tanto en la endometriosis global como en la ovárica. De nuevo se muestra el papel del estroma en la expresión de los factores pro-inflamatorios en la endometriosis, variando estos valores según la localización de la misma.

Teniendo en cuenta que se estima que la IL-17 juega un papel importante en la estimulación del desarrollo de la endometriosis a través del incremento de expresión de COX2 e IL-8 por las células estromales [87, 95], se puede intuir que a la vista de los resultados, su participación en el desarrollo de esta patología viene desarrollándose desde el inicio, y es esencial para la progresión de las células estromales independientemente de su localización. Estos datos tienen una especial relevancia en cuanto al intento de conocer el papel que juega la IL-17 en la endometriosis, ya que es un factor pro-inflamatorio descrito recientemente en esta patología y cuya participación en el desarrollo de la misma no se conoce aún con claridad.

Este estudio muestra un perfil de expresión diferencial entre el tejido endometrial normal y la endometriosis, llegando a ser menor la expresión de factores pro-inflamatorios en la patología probablemente debido a su capacidad para eludir o controlar la respuesta inmune. Por otra parte, se ha evidenciado el papel activo del estroma en la progresión de la endometriosis, así como diferencias significativas entre las diferentes localizaciones de la endometriosis.

Los resultados alcanzados nos permiten conocer más detalles del mecanismo inmunológico de la endometriosis, futuros estudios en esta línea pueden identificar posibles dianas terapéuticas para controlar el proceso.

## ***CONCLUSIONES***

En relación a los objetivos planteados para el desarrollo del presente proyecto, y los resultados obtenidos, las conclusiones son las siguientes:

1. La expresión global de la IL-1 $\beta$ , la IL-6 y la IL-17 es mayor en el tejido endometrial normal que en el tejido con endometriosis.
2. La expresión de la IL-1 $\beta$ , la IL-6 y la IL-17 por las células epiteliales es similar en el tejido normal como en la endometriosis. Sin embargo, la expresión de estos factores por las células mononucleares inflamatorias y los fibroblastos es significativamente menor en la endometriosis respecto al tejido normal, evidenciando el papel del estroma en esta patología.
3. Existe una correlación directa en la expresión de todas las interleuquinas en el endometrio normal y en la endometriosis, salvo en el caso de la IL-1 $\beta$  con la IL-6 en tejido normal. Además se han observado correlaciones directas entre estos factores en las diferentes localizaciones y grados de la endometriosis. Sin embargo, en la endometriosis de grado II existe una correlación inversa entre la expresión de la IL-6 y la IL-17.
4. No se ha observado relación entre la expresión global de los factores a estudio y las características clínico-patológicas de las pacientes controles o con endometriosis.
5. Existe una mayor expresión de IL-1 $\beta$  e IL-6 por las células estromales en las endometriosis localizadas fuera del aparato reproductor. No obstante, no se observó expresión de estos factores en el estroma de las endometriosis localizadas en los órganos pélvicos intraperitoneales.

## ***BIBLIOGRAFÍA***

1. Ayala Yanez, R. and M. Mota Gonzalez, *[Endometriosis: physiopathology and investigation trends (first part)]*. Ginecol Obstet Mex, 2007. **75**(8): p. 477-83.
2. Holt, V.L. and N.S. Weiss, *Recommendations for the design of epidemiologic studies of endometriosis*. Epidemiology, 2000. **11**(6): p. 654-9.
3. Keettel, W.C. and R.J. Stein, *The viability of the cast-off menstrual endometrium*. Am J Obstet Gynecol, 1951. **61**(2): p. 440-2.
4. Ridley, J.H. and I.K. Edwards, *Experimental endometriosis in the human*. Am J Obstet Gynecol, 1958. **76**(4): p. 783-9; discussion 789-90.
5. Halme, J., et al., *Retrograde menstruation in healthy women and in patients with endometriosis*. Obstet Gynecol, 1984. **64**(2): p. 151-4.
6. Sanfilippo, J.S., et al., *Endometriosis in association with uterine anomaly*. Am J Obstet Gynecol, 1986. **154**(1): p. 39-43.
7. Witz, C.A., I.A. Monotoya-Rodriguez, and R.S. Schenken, *Whole explants of peritoneum and endometrium: a novel model of the early endometriosis lesion*. Fertil Steril, 1999. **71**(1): p. 56-60.
8. Witz, C.A., et al., *Short-term culture of peritoneum explants confirms attachment of endometrium to intact peritoneal mesothelium*. Fertil Steril, 2001. **75**(2): p. 385-90.
9. Oral, E. and A. Arici, *Pathogenesis of endometriosis*. Obstet Gynecol Clin North Am, 1997. **24**(2): p. 219-33.
10. Olovsson, M., *Immunological aspects of endometriosis: an update*. Am J Reprod Immunol, 2011. **66 Suppl 1**: p. 101-4.
11. Lebovic, D.I., M.D. Mueller, and R.N. Taylor, *Immunobiology of endometriosis*. Fertil Steril, 2001. **75**(1): p. 1-10.
12. Simpson, J.L., et al., *Genetics of endometriosis*. Obstet Gynecol Clin North Am, 2003. **30**(1): p. 21-40, vii.
13. Vigano, P., et al., *Endometriosis: epidemiology and aetiological factors*. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol, 2004. **18**(2): p. 177-200.
14. Brosens, I.A., *Endometriosis--a disease because it is characterized by bleeding*. Am J Obstet Gynecol, 1997. **176**(2): p. 263-7.
15. Nisolle, M. and J. Donnez, *Peritoneal endometriosis, ovarian endometriosis, and adenomyotic nodules of the rectovaginal septum are three different entities*. Fertil Steril, 1997. **68**(4): p. 585-96.
16. Hoeger, K.M. and D.S. Guzick, *Classification of endometriosis*. Obstet Gynecol Clin North Am, 1997. **24**(2): p. 347-59.
17. Eskenazi, B. and M.L. Warner, *Epidemiology of endometriosis*. Obstet Gynecol Clin North Am, 1997. **24**(2): p. 235-58.
18. Abbas, S., et al., *Prevalence and incidence of diagnosed endometriosis and risk of endometriosis in patients with endometriosis-related symptoms: findings from a statutory health insurance-based cohort in Germany*. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2012. **160**(1): p. 79-83.
19. Balasch, J., et al., *Visible and non-visible endometriosis at laparoscopy in fertile and infertile women and in patients with chronic pelvic pain: a prospective study*. Hum Reprod, 1996. **11**(2): p. 387-91.
20. Rawson, J.M., *Prevalence of endometriosis in asymptomatic women*. J Reprod Med, 1991. **36**(7): p. 513-5.
21. Sangi-Haghpeykar, H. and A.N. Poindexter, 3rd, *Epidemiology of endometriosis among parous women*. Obstet Gynecol, 1995. **85**(6): p. 983-92.
22. Grace, V.M. and K.T. Zondervan, *Chronic pelvic pain in New Zealand: prevalence, pain severity, diagnoses and use of the health services*. Aust N Z J Public Health, 2004. **28**(4): p. 369-75.
23. Buck Louis, G.M., et al., *Incidence of endometriosis by study population and diagnostic method: the ENDO study*. Fertil Steril, 2011. **96**(2): p. 360-5.

24. Sinaii, N., et al., *High rates of autoimmune and endocrine disorders, fibromyalgia, chronic fatigue syndrome and atopic diseases among women with endometriosis: a survey analysis*. Hum Reprod, 2002. **17**(10): p. 2715-24.
25. Cuevas, M., et al., *Stress Exacerbates Endometriosis Manifestations and Inflammatory Parameters in an Animal Model*. Reprod Sci, 2012.
26. Augoulea, A., et al., *Pathogenesis of endometriosis: the role of genetics, inflammation and oxidative stress*. Arch Gynecol Obstet, 2012.
27. Cramer, D.W., et al., *The relation of endometriosis to menstrual characteristics, smoking, and exercise*. JAMA, 1986. **255**(14): p. 1904-8.
28. Signorello, L.B., et al., *Epidemiologic determinants of endometriosis: a hospital-based case-control study*. Ann Epidemiol, 1997. **7**(4): p. 267-741.
29. *Risk factors for pelvic endometriosis in women with pelvic pain or infertility. Gruppo Italiano per lo Studio dell' endometriosi*. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 1999. **83**(2): p. 195-9.
30. Parazzini, F., et al., *Previous abortions and risk of pelvic endometriosis*. Hum Reprod, 1998. **13**(11): p. 3283-4.
31. Vessey, M.P., L. Villard-Mackintosh, and R. Painter, *Epidemiology of endometriosis in women attending family planning clinics*. BMJ, 1993. **306**(6871): p. 182-4.
32. Kirshon, B. and A.N. Poindexter, 3rd, *Contraception: a risk factor for endometriosis*. Obstet Gynecol, 1988. **71**(6 Pt 1): p. 829-31.
33. Nisolle-Pochet, M., F. Casanas-Roux, and J. Donnez, *Histologic study of ovarian endometriosis after hormonal therapy*. Fertil Steril, 1988. **49**(3): p. 423-6.
34. Malinak, L.R., et al., *Heritage aspects of endometriosis. II. Clinical characteristics of familial endometriosis*. Am J Obstet Gynecol, 1980. **137**(3): p. 332-7.
35. Nouri, K., et al., *Family incidence of endometriosis in first-, second-, and third-degree relatives: case-control study*. Reprod Biol Endocrinol, 2010. **8**: p. 85.
36. Jacobson, T.Z., et al., *Laparoscopic surgery for subfertility associated with endometriosis*. Cochrane Database Syst Rev, 2010. (1): p. CD001398.
37. Rocha, A.L., F.M. Reis, and F. Petraglia, *New trends for the medical treatment of endometriosis*. Expert Opin Investig Drugs, 2012.
38. Somigliana, E., et al., *Surgical measures for endometriosis-related infertility: a plea for research*. Placenta, 2011. **32 Suppl 3**: p. S238-42.
39. Diwadkar, G.B. and T. Falcone, *Surgical management of pain and infertility secondary to endometriosis*. Semin Reprod Med, 2011. **29**(2): p. 124-9.
40. Bulletti, C., et al., *Endometriosis and infertility*. J Assist Reprod Genet, 2010. **27**(8): p. 441-7.
41. Huang, H.Y., *Medical treatment of endometriosis*. Chang Gung Med J, 2008. **31**(5): p. 431-40.
42. Brosens, I., *Endometriosis and the outcome of in vitro fertilization*. Fertil Steril, 2004. **81**(5): p. 1198-200.
43. Olivennes, F., *[Results of IVF in women with endometriosis]*. J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris), 2003. **32**(8 Pt 2): p. S45-7.
44. Giudice, L.C. and L.C. Kao, *Endometriosis*. Lancet, 2004. **364**(9447): p. 1789-99.
45. Matorras, R., et al., *Women who are not exposed to spermatozoa and infertile women have similar rates of stage I endometriosis*. Fertil Steril, 2001. **76**(5): p. 923-8.
46. Harkki, P., A. Tiitinen, and O. Ylikorkala, *Endometriosis and assisted reproduction techniques*. Ann N Y Acad Sci, 2010. **1205**: p. 207-13.
47. Senapati, S. and K. Barnhart, *Managing endometriosis-associated infertility*. Clin Obstet Gynecol, 2011. **54**(4): p. 720-6.
48. Lessey, B.A., *Assessment of endometrial receptivity*. Fertil Steril, 2011. **96**(3): p. 522-9.
49. Weiss, G., et al., *Inflammation in reproductive disorders*. Reprod Sci, 2009. **16**(2): p. 216-29.
50. Berbic, M. and I.S. Fraser, *Regulatory T cells and other leukocytes in the pathogenesis of endometriosis*. J Reprod Immunol, 2011. **88**(2): p. 149-55.
51. Braun, D.P. and W.P. Dmowski, *Endometriosis: abnormal endometrium and dysfunctional immune response*. Curr Opin Obstet Gynecol, 1998. **10**(5): p. 365-9.



52. Semino, C., et al., *Role of major histocompatibility complex class I expression and natural killer-like T cells in the genetic control of endometriosis*. Fertil Steril, 1995. **64**(5): p. 909-16.
53. De Placido, G., et al., *Serum concentrations of soluble human leukocyte class I antigens and of the soluble intercellular adhesion molecule-1 in endometriosis: relationship with stage and non-pigmented peritoneal lesions*. Hum Reprod, 1998. **13**(11): p. 3206-10.
54. Somigliana, E., P. Vigano, and M. Vignali, *Endometriosis and unexplained recurrent spontaneous abortion: pathological states resulting from aberrant modulation of natural killer cell function?* Hum Reprod Update, 1999. **5**(1): p. 40-51.
55. Garcia-Velasco, J.A., et al., *Macrophage derived growth factors modulate Fas ligand expression in cultured endometrial stromal cells: a role in endometriosis*. Mol Hum Reprod, 1999. **5**(7): p. 642-50.
56. Herington, J.L., et al., *Immune interactions in endometriosis*. Expert Rev Clin Immunol, 2011. **7**(5): p. 611-26.
57. Rocha, A.L., et al., *Activin a Stimulates Interleukin 8 and Vascular Endothelial Growth Factor Release From Cultured Human Endometrial Stromal Cells: Possible Implications for the Pathogenesis of Endometriosis*. Reprod Sci, 2012.
58. Barrier, B.F., *Immunology of endometriosis*. Clin Obstet Gynecol, 2010. **53**(2): p. 397-402.
59. Khoufache, K., et al., *Anomalies in the inflammatory response in endometriosis and possible consequences: a review*. Minerva Endocrinol, 2012. **37**(1): p. 75-92.
60. Berbic, M., et al., *Macrophage expression in endometrium of women with and without endometriosis*. Hum Reprod, 2009. **24**(2): p. 325-32.
61. Wu, M.Y. and H.N. Ho, *The role of cytokines in endometriosis*. Am J Reprod Immunol, 2003. **49**(5): p. 285-96.
62. Seli, E., M. Berkkanoglu, and A. Arici, *Pathogenesis of endometriosis*. Obstet Gynecol Clin North Am, 2003. **30**(1): p. 41-61.
63. Pasoto, S.G., et al., *Endometriosis and systemic lupus erythematosus: a comparative evaluation of clinical manifestations and serological autoimmune phenomena*. Am J Reprod Immunol, 2005. **53**(2): p. 85-93.
64. Mathur, S.P., *Autoimmunity in endometriosis: relevance to infertility*. Am J Reprod Immunol, 2000. **44**(2): p. 89-95.
65. Stanley, A.C. and P. Lacy, *Pathways for cytokine secretion*. Physiology (Bethesda), 2010. **25**(4): p. 218-29.
66. Ginsburg, E.S., et al., *T-helper 2 and 3 type immunity to trophoblast in successful in vitro fertilization-embryo transfer*. Fertil Steril, 2005. **83**(6): p. 1659-64.
67. Sarapik, A., et al., *Follicular proinflammatory cytokines and chemokines as markers of IVF success*. Clin Dev Immunol, 2012. **2012**: p. 606459.
68. Vassiliadis, S., et al., *Endometriosis and infertility: a multi-cytokine imbalance versus ovulation, fertilization and early embryo development*. Clin Dev Immunol, 2005. **12**(2): p. 125-9.
69. Abbas A, L.A., Pillai S., *Inmunología Celular y Molecular*. 2008.
70. Schmitz, J., et al., *IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines*. Immunity, 2005. **23**(5): p. 479-90.
71. Fisman, E.Z., M. Motro, and A. Tenenbaum, *Cardiovascular diabetology in the core of a novel interleukins classification: the bad, the good and the aloof*. Cardiovasc Diabetol, 2003. **2**: p. 11.
72. Podgaec, S., et al., *Endometriosis: an inflammatory disease with a Th2 immune response component*. Hum Reprod, 2007. **22**(5): p. 1373-9.
73. Tabibzadeh, S., J.L. Becker, and A.K. Parsons, *Endometriosis is associated with alterations in the relative abundance of proteins and IL-10 in the peritoneal fluid*. Front Biosci, 2003. **8**: p. a70-8.

74. Podgaec, S., et al., *Th1 and Th2 immune responses related to pelvic endometriosis*. Rev Assoc Med Bras, 2010. **56**(1): p. 92-8.
75. Sharpe-Timms, K.L., et al., *Inflammatory cytokines differentially up-regulate human endometrial haptoglobin production in women with endometriosis*. Hum Reprod, 2010. **25**(5): p. 1241-50.
76. Banerjee, M. and M. Saxena, *Interleukin-1 (IL-1) family of cytokines: Role in Type 2 Diabetes*. Clin Chim Acta, 2012. **413**(15-16): p. 1163-70.
77. Lebovic, D.I., et al., *Induction of an angiogenic phenotype in endometriotic stromal cell cultures by interleukin-1beta*. Mol Hum Reprod, 2000. **6**(3): p. 269-75.
78. Kyama, C.M., et al., *Endometrial and peritoneal expression of aromatase, cytokines, and adhesion factors in women with endometriosis*. Fertil Steril, 2008. **89**(2): p. 301-10.
79. Harada, T., et al., *Apoptosis and endometriosis*. Front Biosci, 2007. **12**: p. 3140-51.
80. Meresman, G.F., et al., *Apoptosis and expression of Bcl-2 and Bax in eutopic endometrium from women with endometriosis*. Fertil Steril, 2000. **74**(4): p. 760-6.
81. El Btaouri, H., et al., *Interleukin-1beta-induced apoptosis through adenylyl cyclase and ERK1/2 inhibition in primary cultured thyroid cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2006. **339**(2): p. 469-76.
82. Marshall, J.C., et al., *Interleukin-1beta mediates LPS-induced inhibition of apoptosis in retinoic acid-differentiated HL-60 cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2008. **369**(2): p. 532-8.
83. Bilotas, M., et al., *Effect of vascular endothelial growth factor and interleukin-1beta on apoptosis in endometrial cell cultures from patients with endometriosis and controls*. J Reprod Immunol, 2010. **84**(2): p. 193-8.
84. Banerjee, J., et al., *IL-6 and mouse oocyte spindle*. PLoS One, 2012. **7**(4): p. e35535.
85. Yoshioka, H., et al., *Menstrual cycle-specific inhibition of the proliferation of endometrial stromal cells by interleukin 6 and its soluble receptor*. Am J Obstet Gynecol, 1999. **180**(5): p. 1088-94.
86. Saito, S., et al., *Clinical implication of recent advances in our understanding of IL-17 and reproductive immunology*. Expert Rev Clin Immunol, 2011. **7**(5): p. 649-57.
87. Hirata, T., et al., *Interleukin (IL)-17A stimulates IL-8 secretion, cyclooxygenase-2 expression, and cell proliferation of endometriotic stromal cells*. Endocrinology, 2008. **149**(3): p. 1260-7.
88. Kyama, C.M., et al., *Potential involvement of the immune system in the development of endometriosis*. Reprod Biol Endocrinol, 2003. **1**: p. 123.
89. Selam, B., et al., *Extracellular matrix-dependent regulation of Fas ligand expression in human endometrial stromal cells*. Biol Reprod, 2002. **66**(1): p. 1-5.
90. Arnold, J.T., et al., *Endometrial stromal cells regulate epithelial cell growth in vitro: a new co-culture model*. Hum Reprod, 2001. **16**(5): p. 836-45.
91. Klemmt, P.A., et al., *Stromal cells from endometriotic lesions and endometrium from women with endometriosis have reduced decidualization capacity*. Fertil Steril, 2006. **85**(3): p. 564-72.
92. Houston, D.E., et al., *The epidemiology of pelvic endometriosis*. Clin Obstet Gynecol, 1988. **31**(4): p. 787-800.
93. *Prevalence and anatomical distribution of endometriosis in women with selected gynaecological conditions: results from a multicentric Italian study. Gruppo italiano per lo studio dell'endometriosi*. Hum Reprod, 1994. **9**(6): p. 1158-62.
94. Yoshino, O., et al., *Activin-A is induced by interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha and enhances the mRNA expression of interleukin-6 and protease-activated receptor-2 and proliferation of stromal cells from endometrioma*. Fertil Steril, 2011. **96**(1): p. 118-21.
95. Hirata, T., et al., *Interleukin-17F increases the secretion of interleukin-8 and the expression of cyclooxygenase 2 in endometriosis*. Fertil Steril, 2011. **96**(1): p. 113-7.

